

多核白血球抽出液による血管内皮細胞

Fc レセプターの発現

——in vivo および in vitro の研究——

浜松医科大学医学部病理学第二講座

佐 野 光 一

(昭和61年1月6日受付)

緒 言

生理的に FcR を有する血管内皮細胞は胎盤の血管⁸⁾及び肝類洞内皮¹⁴⁾に認められているのみであるが、その他の血管内皮細胞も in vitro においてウィルス^{1,19)}および多核白血球抽出液 (polymorphonuclear leucocyte lysate¹⁹⁾: lysate) による障害で Fc レセプター (FcR) を発現するといわれている。1981年 Ryan ら¹⁹⁾は、培養ウシ肺動脈内皮細胞が lysate による障害により FcR 活性を発現すると報告し、それが血管壁への免疫複合体 (immune complex: IC) の沈着をひきおこし、血管炎などの誘因になると考えた。しかし、FcR の出現がその他の血管内皮細胞にも起こりうるのか、あるいは生体内で起こるのかという問題は解決されていない。そこで著者は、in vitro の実験系として培養ヒト臍帯静脈内皮細胞を、in vivo の実験系としてラット皮膚を用い、lysate による血管内皮細胞の FcR の発現に関して peroxidase-抗 peroxidase IgG 法 (PAPIgG 法^{5,15)}) によって検索した。その結果、培養臍帯静脈内皮細胞およびラット皮膚血管内皮は、lysate により FcR 活性を発現することを明らかにした。

材料および方法

1. 培養血管内皮細胞

培養血管内皮細胞として初代ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いた。内皮細胞は Jaffe ら⁹⁾の方法に準じて 0.1% collagenase (和光純薬)+0.02% trypsin inhibitor (Miles Laboratories) にて採取した。採取後、microcoverslip 上に、37°C、5%CO₂ 条件下に20%不活化 γ グロブリン不含ウシ胎児血清を含む M199 培地を

用いて初代単層培養した。培地交換は2日毎に行った。内皮細胞の同定として、凝固第 VIII 因子関連抗原を酵素抗体間接法⁷⁾にて証明した(写真1)。一次抗体として抗ヒト凝固第 VIII 因子関連抗原ウサギ IgG (DAKOPATTS) を用いた。実験には同一臍帯から採取した培養2日目、10日目、および20日目の内皮細胞を用いた(写真2)。

2. PAPIgG および PAPIgGF (ab')₂ の調整

抗 horseradish peroxidase (HRPO) 血清は、ウサギを 3 mg ずつ2回の HRPO (RZ=3.4, 東洋紡) 皮下注射により免疫して得た。初回注射は Freund の complete adjuvant (ヤトロネ) 乳濁液とし、第2回注射は生理食塩水溶液として初回後4週目に行った。この抗血清の45%硫酸分画を DEAE-cellulose でゲル濾過し IgG 分画を分離した。さらに Grey の方法³⁾でこの IgG 分画をペプシン分解し抗 HRPOF (ab')₂ を得た。PAPIgG と HRPO-抗 HRPOF(ab')₂ [PAPIgGF (ab')₂] の調整は Sternberger の方法²¹⁾によった。PAPIgG と PAPF (ab')₂ の濃度は HRPO 含量を指標として、40 μ gHRPO/ml のリン酸緩衝化生理食塩水溶液、pH7.3 (PBS) とした。なお、HRPO 濃度は、403 nm における吸光度係数 (0.001 OD403 は 0.444 μ l の可溶化 HRPO 蛋白質に相当) によった。

3. 熱凝集 IgG の調整

ヒト血清 IgG はプールしたヒト血清を DEAE-cellulose で分離し⁹⁾、凍結乾燥した。これを 20mg/ml の PBS 溶液とし、63°C、20分の加熱処理をした。1000 g にて10分遠心後、その上清を熱凝集 IgG とした。

4. 多核白血球抽出液 (lysate) の調整

表1 多核白血球 lysate によるヒト臍帯静脈培養内皮 Fc レセプターの発現

培 養 期 間	2 日		10 日		20 日	
	lysate	HBSS	lysate	HBSS	lysate	HBSS
PAPIgG	—	—	+	—	+	—
PAPF (ab') ₂	—	—	—	—	—	—
HRPO	—	—	—	—	—	—

+: 陽性 —: 陰性 HBSS: Hanks' balanced salt solution

HRPO: horseradish peroxidase

表2 多核白血球 lysate によるラット皮膚血管内皮 Fc レセプターの発現

作 用 時 間	15 分		30 分		60 分	
	lysate	HBSS	lysate	HBSS	lysate	HBSS
PAPIgG	+	—	++	—	++	—
抗 ClqIgG + PAPIgG	N. D.	N. D.	++	—	N. D.	N. D.
PAPF (ab') ₂	—	—	—	—	—	—
HRPO	—	—	—	—	—	—

++: 強陽性 +: 弱陽性 —: 陰性 N. D.: not done

HBSS: Hanks' balanced salt solution HRPO: horseradish peroxidase

多核白血球はヘパリン加ヒト新鮮血液より辻の方法²²⁾に準じて採取した。Hanks の balanced salt solution, pH7.4, 37°C (HBSS) にて3回洗浄後, 1回凍結融解し 4°C, 10000 g にて30分遠心後, その上清を lysate とした。lysate は多核白血球 10⁸ 個あたり 400 μ l を採取し, HBSS にて6倍希釈して直ちに実験に供した。

5. 培養血管内皮細胞 Fc レセプターの検出

内皮細胞を培養した coverslip を HBSS にて3回洗浄後, lysate 5 μ l を室温にて30分反応させた。HBSS で3回洗浄後, 冷風にて乾燥固定した。lysate の対照として HBSS を用いた。上記に加えて細胞質内への浸透を高めるため, 固定後 PBS に浸し1回凍結融解した内皮細胞も用いた。

FcR の検出には PAPIgG 法を用いた。培養内皮細胞を PBS にて, 洗浄後, PAPIgG を 4°C, 10分反応させた後, 0.005% H₂O₂ と 0.02% 3,3'-diaminobenzidine · 4 HCl (東京化成) を含む液 (0.05 M Tris HCl buffer, pH 7.6) と室温にて10分反応させ peroxidase を発色させた (DAB反応)。ホルマリン固定, 水洗後, ヘマトキシリン液にて10分核染色, 封入した。

6. 培養系実験の対照および阻止実験

PAPIgG の対照として PAPF (ab')₂ および HRPO

単独と反応させた。又, FcR 陽性の阻止実験として熱凝集 IgG による抑制実験²⁾もおこなった。

7. ラット皮膚血管内皮 Fc レセプターの検出

実験には雄 Wistar 系ラット (体重 250 g) を用いた。ラット腹部皮内にそれぞれ屠殺15分, 30分および60分前に lysate および HBSS を 30 μ l 注射し, 瀉血にて屠殺した。直ちに注射局所の組織をドライアイスアセトンにて凍結するとともに, 10%ホルマリンで固定した。凍結組織は, クリオスタットにて 10 μ 切片を作製後, 直ちに冷風にて乾燥し, さらに室温にてイソプロピルアルコール10秒, 次いでアセトン10秒の処理を行った。PBS にて洗浄後, PAPIgG を室温にて30分反応させた後, DAB 反応を室温にて 30 分行い, 以下 in vitro と同様な方法に従った。又, 抗ヒト Clq ウサギ IgG (DAKOPATTS) による抑制実験 (室温, 30分) もあわせて行った。抗体は, ラット血清より Clq を精製して²³⁾ 交叉性のあることを検定した。なお, 使用した抗血清は全て IgG をペプシン分解³⁾して, F (ab')₂ 分画として用いた。ホルマリン固定組織からは, パラフィン切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を行った。

結 果

1. 培養血管内皮細胞 Fc レセプターの検索

表1に示すごとく、培養10日目(写真3)および20日目(写真4)の lysate 処置後 PAPIgG を反応させた内皮細胞にのみ、DAB 反応陽性がみられた。陽性内皮細胞は一部細胞表面に明瞭に染まる(写真5)が多くは細線維状に染まった(写真6)。HBSS 処置後 PAPIgG を反応させたもの(写真7)、lysate 処置後 PAPF (ab')₂ を反応させたもの(写真8)および培養2日目の内皮細胞ではいずれの細胞でも DAB 反応陰性であった。固定後凍結融解した内皮細胞でも同様な結果であった。

この DAB 反応は熱凝集 IgG 5 mg/ml にて大部分が、15 mg/ml にて完全に抑制された。

2. Lysate 注射ラット腹部皮膚の組織学的所見

Lysate を注射した皮膚では、真皮および皮下組織の浮腫、血管拡張および細静脈内における多核白血球の margination がみられた。HBSS 処置の皮膚では、はっきりとした炎症の所見はみられなかった。

3. ラット皮膚血管内皮 Fc レセプターの検索

表2に示すごとく、lysate 注射後 PAPIgG を反応させた皮膚にのみ、その真皮および皮下組織内細静脈内皮の一部に DAB 反応が陽性であった。

DAB 反応は細胞表面および細胞質内にみられた(写真9, 10, 11)。また、抗 ClqIgG による抑制実験後にも DAB 反応陽性であった。DAB 反応陽性細胞としてその他に多核白血球(写真12)及び組織球と思われる大単核細胞(写真9)がみられた。

lysate 注射後 PAPF(ab')₂ を反応させたものでは血管内皮および組織球はいずれも陰性であった(写真12)。

考 察

血管内皮細胞の FcR については生理的には胎盤の血管⁹⁾ および肝類洞内皮¹⁴⁾ にその存在が知られ、IC の捕捉機構あるいは免疫グロブリンの輸送機構への関与が考えられている。その他の部位の血管内皮細胞については、いくつかの検索がなされ^{18, 20)}、存在しないとされている。今回の実験ラット皮膚の血管内皮にも、対照群には FcR 活性はみられなかった。ただし FcR 活性の検出に用いられる方法はさまざまで、感度の差異もあり、常に対照との比較を以て判断されるべきであろう。in vitro 実験において内皮細胞への PAPIgG の結合はみられたが、PAPF (ab')₂ および単独 HRP では全く結合しなかった。さらに熱凝集 IgG により dose-dependent に PAPIgG の結合が抑制されたことより PAPIgG は IgG 分子の Fc 部分

で結合したといえる。また、in vivo 実験における内皮への PAPIgG の結合は抗 Clq による抑制の起こらないことより、内皮への Clq の結合を介するもの¹⁰⁾ ではないと考えられる。

今回の実験で血管内皮は in vivo および in vitro いずれの系においても lysate による障害で FcR 活性を発現することが明らかになった。その FcR 活性は培養内皮細胞では細胞表面および細胞質内にあると思われる細線維状物にみられた。Ryan らは lysate 中にある protease の作用により内皮の glycocalyx の一部がのぞかれ、FcR が顕在化してくる^{16, 17)} という仮説をたてた。一方、1984年 Hansson ら⁴⁾ は抽出 vimentin を用いた研究から、障害大動脈内皮細胞に FcR 活性が出現するのは、もともと内皮細胞の中間帯フィラメントである vimentin filament に IgG に対する Fc 結合部位が存在し、障害により膜の透過性が高まり IgG が付着すると報告している。細線維状にみられた FcR 活性にはこれに相当するものがあると思われる。ただし Hansson らは障害をうけていない内皮細胞の vimentin filament も Fc 結合部位を有するとしているが、今回の実験に用いた lysate 無処置の血管内皮細胞では、凍結融解して浸透性を充分高めた後にも DAB 反応はみられなかった。すなわち、少なくとも IC 沈着に関しては、細胞障害により細胞内 filament が何らかの修飾をうける必要があると考えられる。

Ryan らは FcR の検出に、擦過法にて浮遊させた内皮細胞に感作ヒツジ赤血球法を用いたため FcR 活性の局在については不明確であった。今回の実験では PAPIgG 法を用いることにより培養内皮細胞における FcR 活性の局在を明らかにできた。

Ryan ら¹⁹⁾ は、培養ウシ肺動脈内皮細胞において lysate の障害により FcR 活性が発現することを観察したわけであるが、Hansson らの実験結果や今回の実験結果とあわせて考えると、lysate による FcR 活性の発現はさまざまな血管内皮におこりうると考えられる。ラット皮内注射実験において FcR 活性が細静脈領域の内皮にのみ見られたのは、注射された lysate がこの血管領域の内皮にのみ到達したためと思われる。細静脈領域は炎症反応において、白血球の margination および遊出のおこる場であり¹²⁾、白血球は血管内においても IC を貪食して顆粒内容を放出することが観察されている¹³⁾。このような場合に、はたして内皮に FcR が発現することがあるかないかは種々の血管炎の病理発生と関連して興味のもたれるところ

である。

FcR 陽性内皮は培養10日目および20日目の内皮細胞に認められ、2日目の内皮細胞では認められなかった。その理由として考えられるのは培養初期には内皮細胞単離時の酵素障害からの膜の修復が不十分である可能性、培養初期には内皮細胞は増殖期にあり、紡錘形の形態をとり内皮細胞として未成熟である¹¹⁾こと、あるいはこの時期の内皮細胞は何らかの理由でlysateに対して抵抗性がある可能性などである。

以上培養ヒト臍帯静脈内皮細胞およびラット皮膚の細静脈内皮は、多核白血球 lysate により、Fc レセプター活性を発現することを PAPIgG 法により明らかにした。FcR 活性は内皮細胞表面に発現するものと細胞質内に発現するものと2つに区別された。細胞表面の FcR は、Ryan ら¹⁹⁾の報告した FcR に相当すると考えられ、in vivo でも内皮細胞による IC の捕捉ないし輸送機構が存在する可能性が示唆された。一方、細胞質内にも IC の結合が観察された。この現象には、Hansson らが報告したように vimentin などが関与していると思われるが、凍結融解による単純な膜障害のみでは細胞質内への結合は起らなかった。細胞膜の障害のみではなく、filament に何らかの修飾のあることが必要と考えられた。

文

- 1) Cines, D. B., Lyss, A. P. and Bina, M.: Fc and C3 receptors induced by herpes simplex virus on cultured human endothelial cells. J. Clin. Invest. 69: 123-128, 1982.
- 2) Dickler, H. B. and Kunkel, H. G.: Interaction of aggregated γ -globulin with B lymphocytes. J. Exp. Med. 136: 191-196, 1972.
- 3) Grey, H. M. and Kunkel, H. G.: H chain subgroups of myeloma proteins and normal γ S γ -globulin. J. Exp. Med. 120: 253-266, 1964.
- 4) Hansson, G. K., Starkebaum, G. A., Benditt, E. P. and Schwartz, S. M.: Fc-mediated binding of IgG to vimentin-type intermediate filaments in vascular endothelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 3103-3107, 1984.
- 5) Itoh, G., Miura, S. and Suzuki, I.: Immunohistochemical detection of Fc receptor. I. Light microscopic demonstration of Fc receptor by using soluble immune complexes of

結 語

多核白血球抽出液による血管内皮細胞 Fc レセプター発現に関して PAPIgG 法による検索を行い以下の結果を得た。

- 1) 初代単層培養2日目、10日目および20日目のヒト臍帯静脈内皮細胞に、室温にて30分多核白血球抽出液を作用させることにより、培養10日目、20日目の内皮細胞は細胞表面および細胞質内に Fc レセプター活性を発現した。しかし、培養2日目の内皮細胞に Fc レセプター活性は発現しなかった。
- 2) ラット腹部皮膚に 30 μ l の抽出液を皮内注射することにより、真皮および皮下組織の細静脈領域内皮は Fc レセプター活性を発現した。

謝 辞

稿を終えるに当り、御指導、御校閲を賜りました白澤春之教授に深甚の謝意を表し、同時に終始熱心な御指導、御助言をいただきました室博之博士に心から感謝申しあげます。また、ご協力いただいた小杉伊三夫先生、培養技術の御指導をいただいた浜松医科大学病理学第一講座内藤恭久先生に厚く御礼申し上げます。又、臍帯の御提供をいただいた岩本産婦人科医院の皆様方に感謝申しあげます。

献

- peroxidase-antiperoxidase immunoglobulin G. J. Histochem. Cytochem. 25: 252-258, 1977.
- 6) Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R.: Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. J. Clin. Invest. 52: 2745-2756, 1973.
 - 7) Johnson, G. D., Holborow, E. J. and Dorling, J.: Immunofluorescence and immunoenzyme techniques. Chapter 15 in: Immunochemistry. D. M. Weir (editor). Vol. 1 of Handbook of Experimental Immunology. Oxford. London. Edinburgh. Melbourne, Blackwell Scientific Publications, pp. 26-28, 1978.
 - 8) Johnson, P. M., Faulk, W. P. and Wang, A. C.: Immunological studies of human placenta: subclass and fragment specificity of binding of aggregated IgG by placental endothelial cells. Immunology 31: 659-664, 1976.

- 9) Johnstone, A. P. and Thorpe, R.: Immunochemistry in Practice. Oxford. London. Edinburgh. Boston. Melbourne, Blackwell Scientific Publications, pp 44-46, 1982.
- 10) Linder, E.: Binding of Clq and complement activation by vascular endothelium. J. Immunol. 126 : 648-658, 1981.
- 11) Maciag, T., Kadish, J., Wilkins, L., Stermerman, M. B. and Weinstein, R. Organizational behavior of human umbilical vein endothelial cells. J. Cell Biol. 94 : 511-520, 1982.
- 12) Marchesi, V. T. and Florey, H. W.: Electron micrographic observations on the emigration of leucocytes. Q. J. Exp. Physiol. 45 : 343-374, 1960.
- 13) Movat, H. Z., Uriuhara, T., Taichman, N. S., Rowsell, H. C. and Mustard, J. F.: The role of PMN-leucocyte lysosomes in tissue injury, inflammation and hypersensitivity. Immunology 14 : 637-648, 1968.
- 14) 室 博之, 白澤春之, 高橋洋平: マウス肝類洞構成細胞の Fc receptor. とくに類洞内皮細胞における Fc receptor の存在について。日綱会誌 20 : 21-26, 1980.
- 15) 室 博之, 白澤春之, 高橋洋平, 五藤雅博: Fc receptor の組織学的証明方法の検討。マウス肝を対象として, 日綱会誌 20 : 13-19, 1980.
- 16) Ryan, U. S. and Ryan, J. W.: Cell biology of pulmonary endothelium. Circulation. 70(suppl III): III 46-62, 1984.
- 17) Ryan, U. S. and Ryan, J. W.: The ultrastructural basis of endothelial cell surface functions. Biorheology. 21 : 155-170, 1984.
- 18) Ryan, U. S., Schultz, D. R., Del Vecchio, P. J. and Ryan, J. W.: Endothelial cells of bovine pulmonary artery lack receptors for C3b and for the Fc portion of immunoglobulin G. Science 208 : 748-749, 1980.
- 19) Ryan, U. S., Schultz, D. R. and Ryan, J. W.: Fc and C3b receptors on pulmonary endothelial cells: Induction by injury. Science 214 : 557-558, 1981.
- 20) Shingu, M., Hashimoto, Y., Johnson, A. R. and Hurd, E. R.: The search for Fc receptors on human tissues and human endothelial cells in culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 167 : 147-155, 1981.
- 21) Sternberger, L. A., Hardy, P. H., Cuculis, J. J. and Meyer, H. G.: The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: Preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J. Histochem. Cytochem. 18 : 315-333, 1970.
- 22) 辻 芳郎: 白血球実験法。第5章: 白血球と食作用。水上茂樹, 柿沼カツ子編, 東京, 講談社, pp 192-193, 1979.
- 23) Yonemasu, K. and Stroud, R. M.: Clq: Rapid purification method for preparation of monospecific antisera and for biochemical studies. J. Immunology 106 : 304-313, 1971.

写 真 説 明

1. 培養10日目のヒト臍帯静脈内皮細胞。凝固第 VIII 因子関連抗原陽性像を示す。間接抗体法による。(×160倍)
2. 培養5日目のヒト臍帯静脈内皮細胞の位相差顕微鏡像。細胞は紡錘形および多角形の形態をしめす。(×160倍)
3. 培養10日目の内皮細胞。lysate 処置後 PAPIgG を反応。DAB 反応陽性細胞が散在性に認められる。(×132倍)
4. 培養20日目の内皮細胞。lysate 処置後 PAPIgG を反応。DAB反応陽性細胞が散在性に認められる。(×100倍)
5. 写真3.の矢印の細胞の拡大像。矢じりで示すように細胞表面に強い、DAB 反応陽性像を認める。(×2000倍)
6. 写真3.の矢じりの細胞の拡大像。細線維状に DAB 反応陽性像を認める。(×1320倍)
7. 培養10日目の内皮細胞。HBSS 処置後 PAPIgG を反応。DAB 反応陽性細胞は認められない。(×132倍)

8. 培養10日目の内皮細胞。lysate 処置後 PAPF (ab')₂ を反応。DAB 反応陽性細胞は認められない。
(×100倍)
9. ラット腹部真皮。lysate 注射後 (30分) PAPIgG を反応。矢じりは細静脈を示す。矢印の内皮は DAB 反応陽性。組織球と思われる紡錘形細胞 (*) も DAB 反応陽性。(×536倍)
10. ラット腹部真皮。lysate 注射後 (30分) PAPIgG を反応。矢印は細静脈の横断面を示す。内皮に DAB 反応陽性像がみられる。(×400倍)
11. ラット腹部真皮。lysate 注射後 (30分) PAPIgG を反応。矢印は DAB 反応陽性の毛細血管内皮の横断像。(×1320倍)
12. ラット腹部真皮。lysate 注射後 (30分) PAPF (ab')₂ を反応。血管内皮及び組織球はいずれも DAB 反応陰性である。DAB 反応陽性細胞は内因性ペルオキシダーゼの染め出された多核白血球 (*) である。
(×536倍)



