

ゲラチンスポンジ塞栓下での血管再疎通時におけるフィブロネクチンの局在

川崎医科大学 皮膚科
荒 川 雅 美
(昭和62年2月28日受理)

Localization of Fibronectin in Recanalization of Blood Vessels with Gelatin Sponge Embolization

Masami Arakawa

Department of Dermatology, Kawasaki Medical School

(Accepted on February 28, 1987)

血管再疎通時におけるフィブロネクチンの局在について検討した。家兎耳介動脈にゲラチンスポンジを塞栓させ、塞栓部位を経時的に生検し、ヘマトキシリン・エオジン染色と、抗フィブロネクチン抗体による蛍光抗体間接法を施行した。ヘマトキシリン・エオジン標本ではいまだ内皮細胞が障害脱落している動注1週間後、蛍光抗体間接法では、動注直後より消失していた弾性板内側のフィブロネクチンが再び陽性となった。内皮細胞損傷後の血管修復のごく初期の段階では、まずフィブロネクチンなどが、動脈壁に接着し透過性亢進の阻止などの役割を負うと思われる。

This paper demonstrates the localization of fibronectin (FN) at injury and repair of blood vessels. Rabbits caudal auricular arteries were embolized with gelatin sponge powder. Biopsy specimens were taken from the embolic lesions. These were stained with hematoxyline-eosin solution and anti-FN antibody employing indirect immunofluorescence method. FN was found to localize along the inner side of elastic membrane at one week after embolization, although the endothelial cells of most lesions had disappeared. From these observations, it seems that FN would appear initially at the time of regeneration of the inner coat and inhibit the increased vascular permeability.

Key Words ① Fibronectin (FN) ② Recanalization of blood vessels

緒 言

fibronectin (FN)^{1),2)} は約22万の2本のサブユニットから成り、互いにS-S結合で結ばれた分子量約44万の糖蛋白であり、基底膜、線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、macrophageなどにより合成分泌され、その膜表

面に分布する従来 cell surface protein (SSP), cell adhesion factor (CAF) などと呼ばれていた cellular FN³⁾ と、cold-insoluble globulin (CIG)⁴⁾ として循環血液中に0.3mg/dlの濃度で存在する plasma FN とに大別される。この2種のFNは非常に類似しており、免疫学的には両者は区別不能とされている。FN

は、fibrin, fibrinogen, collagen と親和性を持ち、活性化 XIII 因子の作用によりこれらの蛋白に架橋結合し、細胞-細胞間、細胞-基質間粘着、組織修復^{5),6)} オプソニン作用などの生物学的活性を持つものである。この結合組織成分が、血管障害に際しても、血液-血管相互作用に重要な役割を演ずるであろうことは、当然種々推測されているところである。そこで、血管損傷、修復時の FN の動態を知るため、ゲラチンスポンジによる家兎耳介動脈塞栓法を用いて、血管再疎通過程における FN の局在について、観察、検討した。ゲラチンスポンジによる家兎耳介動脈塞栓法については、既報⁷⁾ で詳細している。

材料および方法

ゲラチンスポンジは、抗原性を有さず、毛細血管を通過せず、組織内においては数カ月で吸収される。この粒状物 10 mg と pH 7.2 の phosphate buffered saline 0.5 ml との懸濁液を作製し、体重 2.5 kg ~ 3.5 kg の fresh giant 系家兎雌の caudal auricular artery, intermediate branche に経皮的に動注し、同動脈に塞栓を形成させた (Fig. 1)。以上の操作は

無菌的に行った。動注部より末梢の同血管塞栓部を、1 時間後、24 時間後、3 日後、1 週間後、3 週間後にそれぞれ 5 検体ずつ生検した。また、同時に、未処置家兎の同血管も 5 検体採取した。生検標本は 2 分し、10%ホルマリン固定パラフィン切片と、4 μ 無固定凍結切片とを作製した。パラフィン切片は hematoxyline-eosin (H-E) 染色を、無固定凍結切片には一次抗体として抗ウサギ FN ヤギ抗体 (coppel) を、二次抗体として FITC 標識抗ヤギ IgG 抗体 (MBL) を用いて蛍光抗体間接法を施行した。

結 果

未処置正常血管では血管内皮細胞、弾性板内側部、血管壁中膜部に一致して FN の沈着がみられた。ゲラチンスポンジ動注 1 時間後、H-E 標本では、血管内腔へのゲラチンスポンジの塞栓、血管内皮細胞の消失脱落があるが、炎症細胞反応はみられない。蛍光抗体間接法では、中膜部に陽性所見が得られたが、弾性板の自発蛍光以外に、内膜部に一致する場所に有意な陽性所見は認められなかった。動注 24 時間後 H-E 標本では、血管内腔のゲラチンスポンジ塞栓、血管内皮細胞の消失、脱落に加え、血管壁外膜

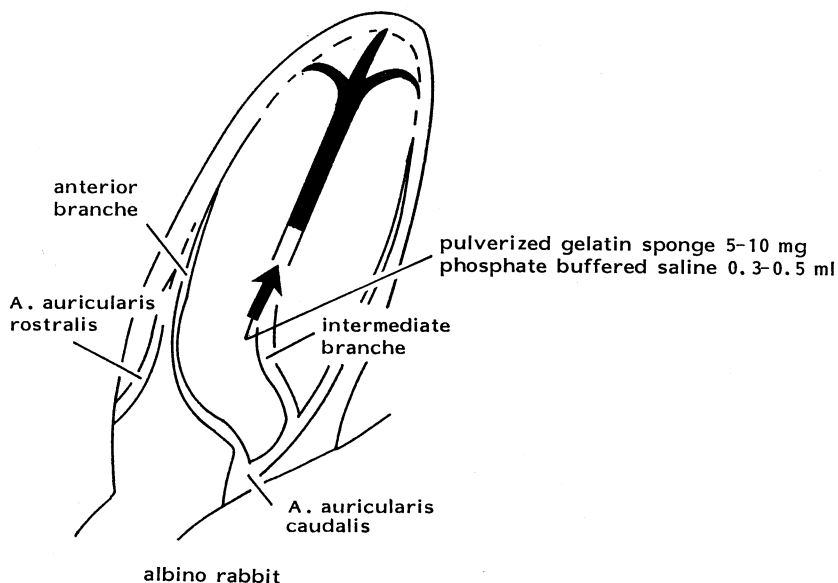


Fig. 1. The schema for embolization of the rabbit auricular artery.

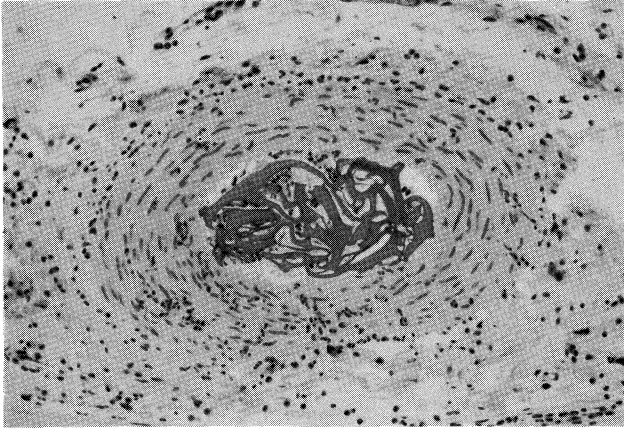


Fig. 2. 24 hours after embolization. Arterial lumen was occupied by gelatin sponge. Endothelial cells of inner coat had disappeared (H-E stain, ×200).



Fig. 3. 24 hours after embolization. FN was positive along middle coat and embolized gelatin sponge (anti-FN antibody stain, ×200).

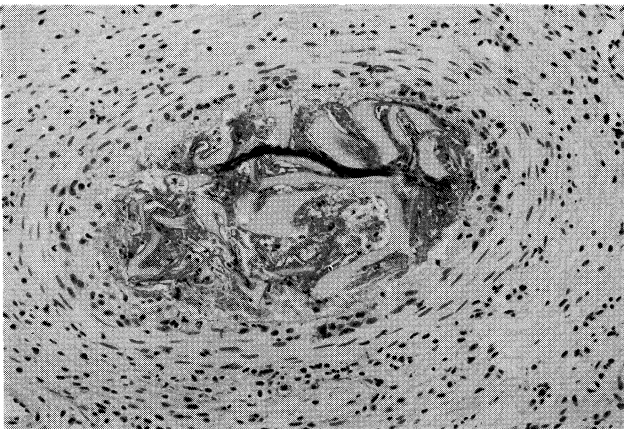


Fig. 4. One week after embolization. The spogen's canerous structure began to lose. Endothelial cells of most lesions had disappeared (H-E stain, ×200).

部および血管周囲に多核白血球浸潤がみられた (Fig. 2). 蛍光抗体間接法では, FN は血管中膜部と一部塞栓したゲラチンスポンジ内に陽性であった (Fig. 3). 動注3日後, H-E 所見では血管壁, 血管周囲の炎症細胞浸潤は著明に減少し, 血管周囲は浮腫状となり, fibroblast が増加していた. 蛍光抗体間接法では, FN は血管中膜部, 血管周囲, 塞栓したゲラチンスポンジ内に著明である. 動注1週間後の H-E 所見では血管周囲の浮腫状態は減少し, ゲラチンスポンジは融解しかけているが, 内膜部に明瞭な内皮細胞の再生はみられない (Fig. 4). しかし, 同時期に FN は血管中膜部に加え, 弾性板内側に線状に強い陽性所見を示した (Fig. 5). 動注3週間後, 内膜部には内皮細胞を有する新生血管がみられ, 肥厚した内膜はやや紡錘型の細胞より成っていた (Fig. 6). FN は内皮細胞と肥厚した内膜を構成する細胞表面, および弾性板内側に強陽性に認められた (Fig. 7). 各時間経過におけるそれぞれの5検体は, 類似の傾向を示した.

考 按

血管障害時の血管反応は, 血管壁の内皮細胞下に存在する基底膜や結合織と, 血流との接触に始まる. この反応は血管の大小種類や血管障害の程度により異なる. 本法では, 動注直後1時間に H-E 染色で内皮細胞は消失し, 蛍光抗体法で弾性板内側の FN も陰性化しており, 内皮細胞, 基底膜が脱落した状態と考えられる. 内皮細胞の剝離原因のひとつに, 炎症の際の好中球プロテアーゼが, 内皮細胞の FN を分解し,⁸⁾ また活性化された好中球が放出した活性酵素が H_2O_2 となり内皮

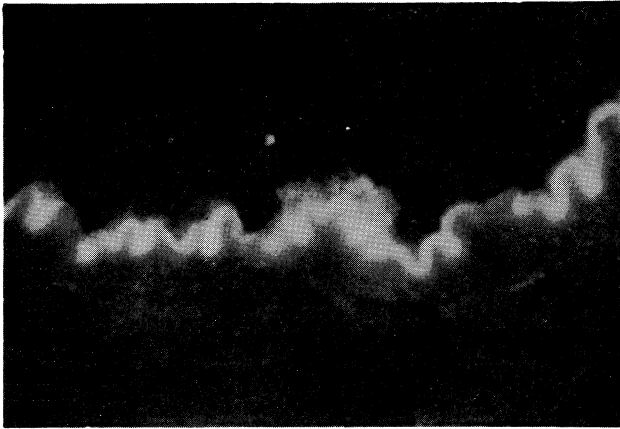


Fig. 5. One week after embolization. FN reappeared positive findings along the inner side of elastic membrane (anti-FN antibody stain, $\times 400$).

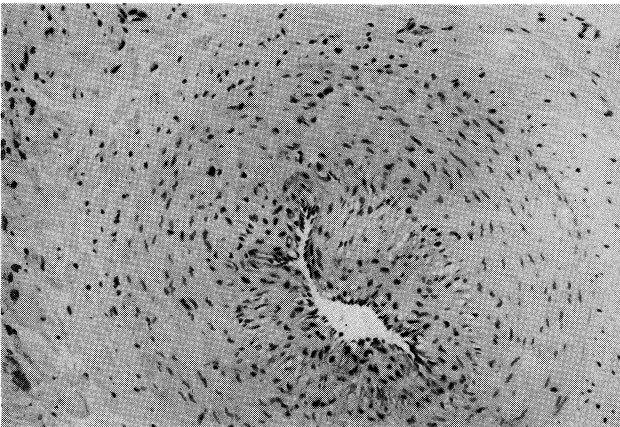


Fig. 6. Three weeks after embolization. The thick inner coat composed of smooth muscle like cells (H-E stain, $\times 200$).

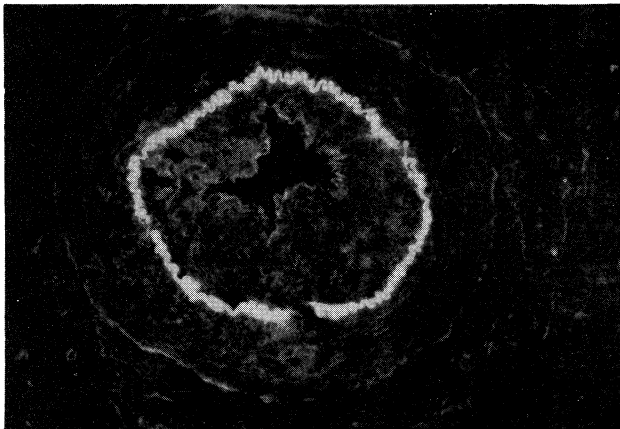


Fig. 7. Three weeks after embolization. Thickened inner coat and middle coat were positive for FN (anti-FN antibody stain, $\times 200$).

細胞の破壊がもたらされることが知られているが,^{9),10)} 本法の場合は多核白血球の浸潤のほとんどない動注1時間後にすでに内皮細胞は脱落しており、この内皮細胞剥離はゲラチンスポンジ塞栓による物理的な障害の結果である。注目すべきは、動注1週間後、H-E所見でいまだ内皮細胞の再生が明瞭でない時期に、動注直後より消失していた弾性板内側のFNが再び線状に認められたことである。Suzukiらは、高血圧ラット動脈において広範な内皮剥離にもかかわらず、初期治癒段階で tracer として投与した墨粒や鉄の血管壁への侵入が阻止されることを観察している。そしてその阻止物質として内膜に沈着した類線維素物質、FN、ラミニンなどを構成成分とする基底膜成分をあげ、plasma FNが動脈壁に接触し線維素-FN結合物が動脈に密に蓄積し、内皮障害にもかかわらず、動脈壁における透過性亢進を阻止したものとして推測している。¹¹⁾ 本所見においても、内皮細胞の剥離脱落と同時に消失していた弾性板内側のFNが、いまだ内皮細胞の再生のない時期に、弾性板内側に線状に認められたことは、内皮細胞障害による血管の損傷、修復過程のごく早期にFNなどの基底膜構成成分が重要な役割を演じているであろうことを示唆している。

また Ross は、高血圧モデル動物で内皮細胞が障害されると、血小板や macrophage から増殖因子が放出され、中膜平滑筋細胞が内膜部に侵入増殖し、細胞線維性の内膜肥厚巣が形成されるとしている。¹²⁾ 本法でも、動注3週間後に内膜肥厚が認められ、その肥厚巣形成細胞の表面にはFNが強陽性に認められた。このことは、同細胞が血管損傷、修復過程における、Ross

唱えるところの synthetic state にあって connective tissue synthesis を行っていることをうかがわせる。すなわち、内皮細胞障害時の血管損傷、修復過程における FN の意義は、ごく初期においては、plasma FN が動物壁に接着して透過性亢進を阻止し、次いで内膜肥厚巣が形成される時期には、増殖平滑筋細胞によって connective tissue synthesis の一端と

して産生されるものであろうと考えた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた川崎医科大学皮膚科学教室 植木宏明教授と幸田衛先生に深謝いたします。

本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費61-403によった。

本論文の要旨は第13回日本研究皮膚科学会において発表した。

文 献

- 1) Nagata, H., Ueki, H. and Moriguchi, T.: Fibronectin; Localization in normal human skin, granulation tissue, hypertrophic scar, mature scar, progressive systemic sclerotic skin, and other fibrosing dermatoses. Arch. Dermatol. 121: 995—999, 1985
- 2) Mosesson, M. W. and Amrani, D. L.: The structure and biologic activities of plasma fibronectin. Blood 56: 145—158, 1980
- 3) Yamada, K. M. and Weston, J. A.: Isolation of a major cell surface glycoprotein from fibroblasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71: 3492—3496, 1974
- 4) Mosesson, M. W. and Umfleet, R. A.: The cold-insoluble globulin of human plasma. J. biol. Chem. 245: 5728—5736, 1970
- 5) Grinnell, F., Billingham, R. E. and Burgess, L.: Distribution of fibronectin during wound healing in vivo. J. invest. Dermatol. 76: 181—189, 1981
- 6) Donaldson, D. J. and Mahan, J. T.: Fibrinogen and fibronectin as substrates for epidermal cell migration during wound closure. J. Cell Sci. 62: 117—127, 1983
- 7) Arakawa, M., Kohda, M. and Ueki, H.: A light-microscopic observation of rabbit auricular artery embolization with gelatin sponge powder. Kawasaki med. J. 12: 191—197, 1986
- 8) McDonald, J. A., Baum, B. J., Rosenberg, D. M., Kelman, J. A., Brin, S. C. and Crystal, R. G.: Destruction of a major extracellular adhesive glycoprotein (fibronectin) of human fibroblasts by neutral proteases from polymorphonuclear leukocyte granules. Lab. Invest. 40: 350—357, 1979
- 9) Weiss, S. T., Young, J., LoBuglio, A. F., Slivka, A. and Nimeh, N. F.: Role of hydrogen peroxide in neutrophil-mediated destruction of cultured endothelial cells. J. clin. Invest. 68: 714—721, 1981
- 10) Fantone, J. C. and Ward, P. A.: Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. Am. J. Pathol. 107: 397—418, 1982
- 11) Suzuki, K., Kawaharada, U., Takatama, M. and Ooneda, G.: Light and scanning electron microscopic and immunohistochemical studies on permeability of hypertensive rat mesenteric arteries. Acta Pathol. Jpn. 35: 1057—1068, 1985
- 12) Ross, R.: Atherosclerosis: A problem of the biology of arterial wall cells and their interactions with blood components. Arteriosclerosis 1: 293—311, 1981