

低張環境における血管内皮細胞の体積変化の経時的測定

藍野大学 医療保健学部 臨床工学科

中村 くるみ

要旨

血漿浸透圧が低下すると血管内皮細胞には浸透圧が負荷されるが、低張液の作用による血管内皮細胞の体積変化はほとんど調べられていない。本研究では、低張液に曝した血管内皮細胞の体積変化を単一細胞で経時的に調べた。その結果、低張液に移すと細胞の体積は10~20分後に等張液中の約125%~150%にまで増加するが、徐々に体積を回復させること、体積回復の程度には細胞個体間に差があることがわかった。

1. はじめに

輸液や疾患等により血漿浸透圧が変化すると、血流に接している血管内皮細胞には浸透圧が負荷される。体外循環中に血漿浸透圧を変化させることもあるが、血管内皮細胞に障害が起こると重大な疾患に繋がる可能性があるため、浸透圧負荷に対する血管内皮細胞の応答を詳細に調べることは重要である。細胞が低張環境に曝されると細胞内に水が流入して体積が増加するが、時間とともに体積が回復する調節機構が働くことが知られており、調節性容積減少 (Regulatory volume decrease, RVD) と呼ばれている¹⁾。しかしながら、低張液の作用による血管内皮細胞の体積変化についてはほとんど調べられていない¹⁾。細胞の大きさや形状、反応性には個体差があるため、浸透圧負荷に対する細胞応答を詳細に調べるためには、細胞集団の平均的な応答をみるよりも、単一の同じ細胞個体について体積変化を経時的に追うことが望ましい。また、基材に接着している細胞は形態が複雑であるため、体積を求めやすい球状の浮遊細胞で体積変化を調べることが望ましいが、浮遊している細胞は溶液の入れ替えの際に流されて細胞を見失ってしまう危険が高い。

近年、臨床工学技士の業務範囲は広がりをみせているが、工学・医学系の知識を活かした物作りや基礎研究を行う能力も将来の臨床工学技士には求められるものと思われる。本研究では、浮遊した単一の血管内皮細胞を等張液から低張液に瞬時に移す方法を考案し、医用材料の知識に基づいて実験に必要な器具の製作を行い、それらを利用して低張液に曝されることによる血管内皮細胞の体積変化を単一細胞で経時的に調べた。

2. 研究目的

本研究の目的は、低張液に曝された血管内皮細胞の体積変化を単一の細胞で経時的に調べることである。

3. 実験方法

本研究の目的を達成するためには、等張液中にある球状の単一細胞を瞬時に低張液に曝す必要がある。細胞外の溶液を入れ替えると細胞が流されてしまうため、等張液の近くに低張液を予め準備しておき、細胞単体を低張液内に移動させることにした。これを実現するために、間に物理的仕切りを設けることなく等張液と低張液を分離して溜められる試験チャンバーを製作し、等張液で満たされた微細なガラス管 (マイクロピ

ペット) 内に細胞を吸い込んで保持して溶液間の細胞移動を行う方法を考えた。細胞を保持した後、マイクロピペットを低張液内に移動させて細胞を低張液中に吐き出し、細胞を低張環境に曝す。

製作した試験チャンバー(図1)の上下面はカバーガラスとなっており、マイクロピペットはチャンバー側面から2枚のカバーガラス間に挿入する。上下のカバーガラスの中央部にシリコンコート剤(Sigmacote)により幅2~3 mmの疎水性帯を作ることによって、中央部に空気層を挟んでチャンバーの左右に等張液と低張液の液溜めを設けた(図1(a))。また、ガラスへの細胞の接着を防ぐために、疎水性帯以外のガラス面は、抗血栓性材料として人工臓器のコーティングに利用されているMPCポリマーでコーティングした(図1(b))。細胞を格納するためのマイクロピペット(先端内径20~25 μm)は外径1 mmのガラス管から自作し、細胞の接着を防ぐために、ピペットの先端部と内部をMPCポリマーでコーティングした²⁾。

細胞の吸い込みと吐き出しにはマイクロピペット吸引装置²⁾を使用した。水が入ったリザーバーとマイクロピペットを水で満たしたチューブを介して接続し、マイクロピペット先端とリザーバー内の水面の高さの差より、マイクロピペット先端部内外に圧力差を発生させることができる。リザーバーの高さはマイクロメータヘッドにより1 μm の精度で可変であり、微弱な圧力を制御することが可能である。

細胞の観察には、倒立型顕微鏡、XY自動ステージ、20倍対物レンズ、顕微鏡用デジタルカメラ、パーソナルコンピュータ、モニタを使用した。イメージングソフトウェア(cellSens, Olympus)を使用して画像の記録と計測を行った。マイクロピペットの操作は三次元電動マイクロマニピュレータで行った。

市販のHBSS(Hanks' balanced salt solution)を等張液(約290 mOsm/kg)として使用し、低張液(約210 mOsm/kg)はHBSSの組成を基にNaCl量を減らして調製した。浸透圧は自動浸透圧計で測定した。

培養し浮遊させたヒト臍帯静脈内皮細胞をチャンバーの等張液内に注入し、顕微鏡下で1つの細胞を選択して画像を記録した。その細胞個体をマイクロピペット内に格納して(図2)低張液中に吐き出し、ただちに1分間隔で60分間にわたり細胞の画像を記録した。各画像から、細胞の輪郭が円であるとみなして細胞の半径を求め、細胞が球形であるとして体積を算出した。各画像につき計測を3回行い、その平均値をその時点での値とした。3細胞個体について計測し、低張液中の細胞体積を等張液中(Isotonic)の値で正規化して変化を調べるとともに、反復測定分散分析(Repeated Measures ANOVA)により統計的解析を行った。

4. 結果と考察

試験チャンバーの上下面を形成するカバーガラスに溶液を弾く疎水性帯を設けることによって、一つのチャンバー内に等張液と低張液が共存でき、チャンバーを大きく傾けない限り溶液同士の接触を防ぐことができた(図1)。溶液の間に物理的な壁が存在しないため細胞の移動も行いやすく、考案した方法と製作した器具を用いて、同一細胞個体で低張環境における体積変化を経時的に観察することが可能であった。

図3に低張液中における細胞の変化の一例を示す。低張液に移して20分後には細胞が膨潤しているが、60分後には大きさが減少している様子がみられた。低張液に移すと血管内皮細胞の体積は有意に増加して10~20分後には等張液中の約125%~150%に達した後、徐々に減少していった(図4, 図5)。このことより、細胞の調節性容積減少(RVD)の機能が働いたと考えられる。Mazzoniら¹⁾は、フローチャンバー底面に単層培養したヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて、低張液に曝された細胞の体積変化を調べている。彼らは、電極を用いてフローチャンバー内の溶液の抵抗を計測して細胞層の高さの変化を検出しており、溶液の浸透圧を半分にすると約10分後に体積は20%増加し、その後は減少に転じて30分後には体積が一定になったが元の体積までは戻らなかったと報告している¹⁾。彼らは最低120 mOsm/kg程度まで浸透圧を下げて調べているのに対して、本研究で使用した低張液の浸透圧は約210 mOsm/kgと比較的高かったが、体積の増加

割合は本研究の方が大きい傾向であった。本研究では拘束のない球状の細胞で計測しており、底面と側面が拘束され上面だけが低張液に曝される単層の場合とは細胞の状態が異なることが応答の違いに繋がった可能性がある。また、本研究では元の体積までは回復しない細胞もあったが、60分以内にほぼ元の体積に戻った細胞もあった（図4）。これらのことは、低張環境に対する細胞の応答、RVDの程度には細胞個体間に差があることを示していると考えられる。

5. おわりに

本研究では、単一の血管内皮細胞を等張液から低張液に移動させる方法を考案し、低張液に曝されることによる血管内皮細胞の体積変化を60分間にわたり単一細胞で経時的に調べた。その結果、低張液に移すと血管内皮細胞の体積は10～20分後にかけて等張液中の約125%～150%にまで増加するが、徐々に体積を回復させていった。このことから、考案して製作した試験チャンバーと実験手法が有用であること、低張環境下において細胞体積の調節機能が血管内皮細胞で働くこと、体積回復の程度には細胞個体間に差があることがわかった。

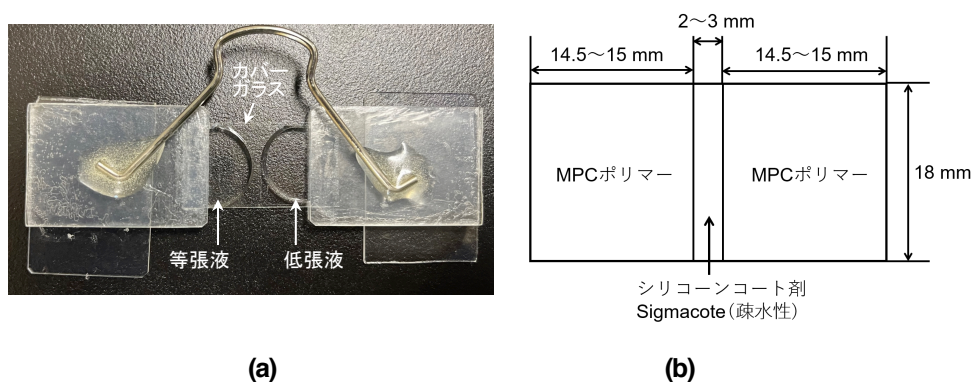


図1 試験チャンバー。(a) 全体像, (b) コーティングしたカバーガラスの模式図 (Top view).

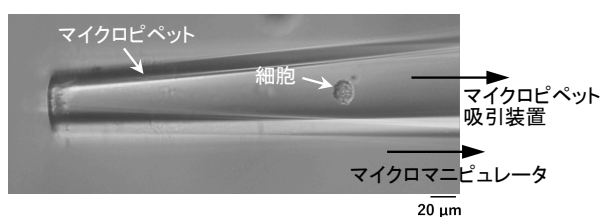


図2 試験チャンバーの等張液中で血管内皮細胞をマイクロピペット内に保持した様子



図3 低張液に曝した血管内皮細胞の変化の一例 (Cell1)

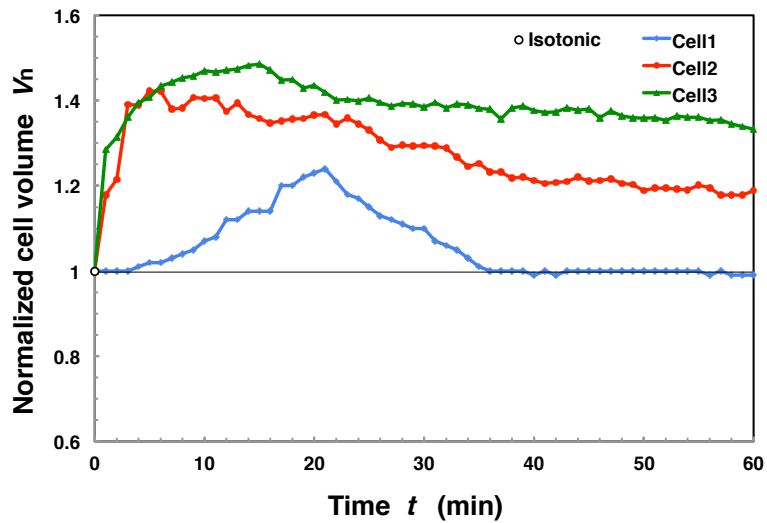


図4 等張液中の体積で正規化した低張液中の細胞体積の経時的変化 (Cell1~Cell3)

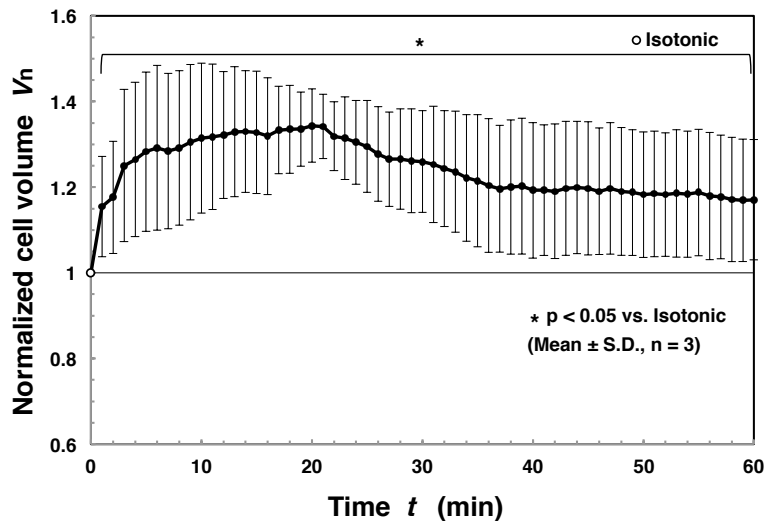


図5 等張液中の体積で正規化した低張液中の細胞体積の経時的変化 (平均値 ± 標準偏差)

文献

- 1) Mazzoni MC, Lundgren R, Arfors K-E, *et al.* : Volume changes of an endothelial cell monolayer on exposure to anisotonic media. *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 140 (2), pp. 272-280, 1989.
- 2) 葦苺健伸 : 低密度培養された血管内皮細胞の粘弾性に及ぼす低張液の影響, 藍野大学医療保健学部臨床工学科令和2年度卒業論文集, pp. 1-9, 2021.

指導教員

藍野大学 医療保健学部 臨床工学科
宮崎 浩