419 超音波照射による血管内皮細胞の力学的特性の変化 —音響強度の影響—

Alteration of mechanical properties of cultured vascular endothelial cells by ultrasound exposure
-Effect of acoustic intensity-

学 ○荒木 要 (阪大院) 正 宮崎 浩 (阪大) 正 和田 成生 (阪大)
Kaname ARAKI, Graduate School of Engineering Science, Osaka Univ., Toyonaka, Osaka 560-8531
Hiroshi MIYAZAKI, Osaka Univ.
Shigeo WADA, Osaka Univ.

1. 緒言 超音波治療器が損傷組織の治癒促進のために利用されている。しかしながら、治療用超音波の照射は血管新生を促進する因子の産生を高めるとの報告はあるものの¹⁾、超音波による治癒促進のメカニズムの詳細は明らかにされていない。血管新生には血管内皮細胞が大きな役割を果たすが、超音波の照射が内皮細胞に与える影響に関する報告は少なく²⁻⁴⁾、特にバイオメカニクスの観点から調べた研究はほとんどない⁴⁾。

そこで本研究では、照射する超音波の音響強度が血管内皮細胞の力学的特性と細胞骨格に及ぼす影響を調べることを目的として、超音波を3通りの音響強度で照射した内皮細胞を所定の時間培養した後、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて細胞の局所的スティフネスを計測するとともに、共焦点レーザ顕微鏡 (CLSM) を用いてアクチンフィラメントの観察を行った。

2. 実験方法

2.1 実験試料 ウシ胸大動脈から採取した内皮細胞 (P=8~13) をガラスボトム培養ディッシュに播種し、50~70%コンフルエントとなるように DMEM+10% FBS 中で24時間培養した。

2.2 細胞への超音波照射と実験群 培養細胞用超音波照射装置を用いて、37°C, pH = 7.4 の培養環境下で内皮細胞に超音波を照射した⁴⁾。超音波の音響強度を0.1, 0.25, 0.5 W/cm²、周波数を1 MHz, duty 比を40%, 照射時間を30分間とし、音響強度により実験群を設定した (US-0.1, US-0.25, US-0.5 群)。経時の変化を調べるため、照射後に CO₂ インキュベータ内で0, 2, 4, 16時間培養した後に、細胞の AFM 計測を行った。照射装置に30分間設置するだけで超音波を照射しない試料を Control 群とした。

2.3 AFM による細胞の力学的特性の計測 原子間力顕微鏡 (Bioscope AFM, Veeco) を用いて、室温の HBSS 中で細胞形態を観察した後に、核を含む 10 μm x 10 μm の計測領域内の 16 x 16 箇所の計測点において局所的スティフネスを計測した。バネ定数 0.02 N/m のカンチレバーを使用し、プローブの押し込み速度を 4 μm/s とした。各計測点で得られた Force (F) - indentation (δ) curve の δ が 0~500 μm の範囲を次式⁵⁾で評価した。

$$F = a(\exp(b\delta) - 1) \text{ or } dF/d\delta = bF + c \quad (c = ab)$$

ここで、c 値は初期スティフネス、b 値はスティフネスの変化率を表す。また、AFM 計測後に細胞の微分干渉画像を取得し、それを基に細胞の核の位置を正確に特定した。核と計測領域の位置関係から、計測点を核上領域と核周辺領域に分類し、領域ごとに各計測点にける b 値と c 値をそれぞれ算出した。

2.4 CLSM によるアクチンフィラメントの観察 超音波照射後に細胞を 2% Formaldehyde 液で固定し、Toriton X-100 で処理した後に AlexaFluor 488-phalloidin でアクチンフィラメントを蛍光染色した。共焦点レーザ顕微鏡 (FV-500, Olympus) を用いてアクチンフィラメントの様子を観察した。

3. 実験結果および考察 各群において、核周辺領域の計測点における b, c 値の平均値を細胞ごとに算出し、それを群内で平均

したものを用いて Fig. 1 に示す。b 値に着目すると、US-0.1 群では照射直後から低い値をとり、その後16時間経過後も低下したままであった。しかしながら、US-0.25 群と US-0.5 群では、照射直後にはほとんど変化せず、照射4時間後に最も低い値をとった後、16時間後には Control 群と同程度の値まで回復する傾向がみられた。c 値は、どの群においても照射2時間後ないしは4時間後に最も低い値をとる傾向を示した。この結果は、超音波が細胞に与える影響は、超音波照射から一定時間経過後に強く現れるとの報告²⁾と傾向が一致する。

全ての群において b, c 値が Control 群よりも低い値をとった照射4時間後にアクチンフィラメントを観察したところ、Control 群では細胞内部に長い明瞭なストレスファイバーがみられたが、超音波を照射した細胞では長いストレスファイバーはみられず、短く寸断された様なアクチンフィラメントが観察された (Fig. 2)。また、その寸断の程度は US-0.1 群の細胞で顕著であった。このアクチン構造の変化が、細胞のスティフネスの低下につながったものと考えられる。

血管内皮細胞に超音波を照射すると、細胞の局所的スティフネスが一時的に低下するとともに、アクチンフィラメントの損傷が観察された。また、低下の始まる時間や程度、アクチンフィラメントの損傷の程度は、照射する超音波の音響強度によって異なることが示唆された。

Fig. 1 Averaged values of parameters b and c in perinuclear region.

Fig. 2 Micrographs of F-actin in endothelial cells. Bar, 20 μm.

参考文献

- 1) Reher, P. *et al.*, Cytokine, 11: 416, 1999.
- 2) Raz, D. *et al.*, Endothelium 12: 201, 2005.
- 3) Mizrahi, N. *et al.*, Ultrasound Med. Biol., 33: 1818, 2007.
- 4) 谷ら, 日本機械学会関西支部第 81 期定時総会講演会講演論文集, 6-16, 2006.
- 5) Miyazaki, H. *et al.*, Med. Biol. Eng. Comput., 37:530, 1999.