細胞の状態を “はかる”

Measure and Estimate the Cell Conditions

執筆者プロフィール

青村 茂

Shigeru AOMURA

■1976年北海道大学工学部機械工学科卒業, 1981年北海道大学大学院工学研究科機械工学専攻博士課程修了

■主として行っている業務・研究

・外部衝撃による頭部損傷のメカニズムの解明, パーキンソン病患者の身体動作の解析と支援, 双腕ロボットの実用化のための自動工程設計法, ヴァイオリン演奏ロボットの設計・試作

■所属学会および主な活動

日本機械学会 (バイオエンジニアリング部門運営委員, 論文校閲委員等), 精密工学会

■勤務先

正員, 首都大学東京教授 システムデザイン研究科

(〒191-0065 東京都日野市旭が丘 6-6/

E-mail: aomura-shigeru@tmu.ac.jp)

中楯 浩康

Hiromichi NAKADATE

■2002年慶應義塾大学理工学部物理情報工学科卒業, 2008年慶應義塾大学大学院理工学研究科基礎理工学専攻, 博士課程修了

■主として行っている業務・研究

・血管内皮細胞・神経細胞の衝撃耐性評価

■所属学会および主な活動

日本機械学会, 日本バイオレオロジー学会

■勤務先

正員, 首都大学東京助教 システムデザイン研究科

(〒191-0065 東京都日野市旭が丘 6-6/

E-mail: nakadate@sd.tmu.ac.jp)

1. はじめに

物理的な諸量を “はかる” という場合, 重さを量る, 長さを測る, 速度を計る, などを連想し, 単位もはっきりしていて直感的でわかりやすい. 生き物の状態を “はかる” となるといろいろな尺度をもって対象の状態を推察するということであり, いろいろな方法や解釈が生まれる. また複数の測定結果を総合して状況を判断することも必要となる. ここでは衝撃を受けた細胞の状態を “はかる” ことを考えてみる.

細胞は生物の最も基本的な構成単位であり, さまざまな生命活動のみならずと云ってよい. 人間の体に何か都合のよくないことがあると, これらの細胞が傷ついたり健全な活動が阻害されたりして, 重度の場合には人間の体も正常に機能しなくなる. たとえば頭部が何らかの事故で障害を受けた場合に, 脳内や脳表面に出血が起きたり, 脳の神経の機能が損なわれたりして活動が低下し, 死亡したり後遺症に苦しむなど, 人体の正常な活動に多大な影響を与える. これらはそれぞれ細胞の正常な活動が阻害されたり細胞そのもの

のが死んだりすることが原因となっている. 本稿では神経細胞や毛細血管を構成する内皮細胞を対象として, 衝撃圧力や衝撃ひずみを受けた場合の細胞の軽度の損傷や機能低下から細胞死あるいは組織の崩壊等に至るまでの過程をさまざまな方法で “測り”, それらが生体に与える影響を “推し量る” 様子を説明する.

2. 細胞状態を測る

過度の機械的な力や変形は, 細胞膜の損傷, カルシウム恒常性の異常, 細胞形態の変化といった機能的, 構造的破綻を引き起こし, 最終的に細胞死に至る (図1). 以下に細胞損傷状態を測る手法を二つ紹介する. 力学刺激により細胞膜が傷害されると, 細胞質酵素である乳酸脱水素酵素 (LDH) が放出される. LDH 放出の測定は細胞毒性の定量化に広く用いられ, 酵素活性量は傷害を受けた細胞の割合と相関することが知られている. 放出された LDH 量は, 図2に示す反応により生成されたホルマザン量を分光光度計で測定することで評価する. 同様に, 細胞膜の傷害を定量的に方法に色素排除

図1 細胞に過度の機械的な力や変形が加わると, その大きさに比例して機能的, 構造的な破綻を引き起こし, 最終的に細胞死に至る

図2 細胞から放出されたLDHは乳酸の脱水素化を触媒しピルビン酸とNADHを生成する。NADHはジアホラーゼの触媒によりテトラゾリウム塩を還元し赤色を呈するホルマザン色素を形成する。ホルマザン色素は490nmの波長の光を最も吸収するため、490nmの吸光度の増大で間接的にLDH活性を測定する。テトラゾリウム塩は490nmで吸収を示さない

図4 正常な神経細胞(上)では細胞体から伸長している神経軸索の太さが一様だが、衝撃ひずみを負荷した神経細胞(下)では神経軸索が局所的に膨張し瘤(矢印)が形成される。スケールバーは100μmを示す

法という手法がある。生細胞では色素は細胞膜を通過しない、もしくは細胞内に入り込んだ色素を細胞外に排出するが、死細胞では色素は細胞膜を通過し、細胞外に色素を排除しないため細胞全体が染色されることを利用した方法である。トリパンプルーは深青色の色素であり、死細胞は青く染色される(図3)。光学顕微鏡と血球計算盤を用いて生細胞と死細胞を数え、総細胞数と生細胞数の割合を求める。

3. 細胞状態を推し量る

細胞に力学刺激を与えると形態変化を引き起こすことがよく知られている。神経細胞の場合、変形を加えると細胞体から長く伸びている軸索が膨張する。膨張部には、細胞の形態維持に必要な細胞骨格タンパク質や情報伝達物質が蓄積しており、軸索膨張は2次的な軸索損傷を引き起こし他の神経細胞への情報伝達を阻害する。図4は、衝撃ひずみを負荷した培養神経細胞を位相差顕微鏡で観察した画像である。生理的な状態では1本の神経軸索の直径はほぼ一様であるのに対し、衝撃ひずみ負荷を与えた神経軸索は多数の膨張(瘤)が認められる。神経軸

索1mmあたりの瘤の数を数えると、衝撃ひずみの大きさに比例して瘤の数は増加し、衝撃ひずみ負荷数分～1時間に急激に増加していた。軸索に生成される瘤を数えることで神経損傷の程度を推測することが可能である。

一方、毛細血管を模擬するために、血管内皮細胞をゲル内でチューブ状に培養した試料に衝撃圧力を負荷すると、チューブ構造が崩壊する様子が観察できる(図5)。1mm²あたりのチューブ長を血管密度として計測すると、ある大きさ以上の衝撃圧力において負荷1時間後から血管密度が減少し、負荷24時間後には負荷前の約半分にまで減少していた。また、構造崩壊を引き起こすレベルより低い衝撃圧力を血管内皮細胞に負荷すると、物質透過性が亢進することが図6の実験系を用いると観察できる。つまり生体内では、衝撃圧力により毛細血管が傷害されて出血を引き起こしたり、内皮細胞同士の結合力が低下し毛細血管内を流れる血漿などが漏出し、浮腫が生成されたりすることが考えられる。

4. おわりに

さまざまな細胞状態を正確に“測る”

図3 生細胞は、色素が細胞膜を通過しないもしくは細胞内に入ってきた色素を細胞外に排出するため染色されないが、死細胞は、色素が細胞膜を通過し細胞全体が染色される。一定体積中の生細胞と死細胞を数え、総細胞数と生細胞数の割合を求める

図5 ゲル内でチューブ状に培養した血管内皮細胞に衝撃圧力を負荷すると、網目状にネットワークを形成していたチューブの一部(矢印)が切断される。スケールバーは100μmを示す

図6 微小な穴が多数空いた上層に血管内皮細胞を培養し衝撃圧力を負荷する。微小な穴を通過できる蛍光標識されたデキストランを上層に添加し、時間経過とともに下層に透過したデキストラン量を計測する

ことができれば、細胞状態が生体に対する影響をより詳細に“推し量る”ことができるかもしれない。われわれは、外傷を受けた神経細胞や血管内皮細胞の状態がどのような挙動を示すかを正確に知ること、損傷程度の予測や機械的な損傷機序解明の一助となり、新たな診断法や創薬に繋がることを期待する。