九州大学学術情報リポジトリ Kyushu University Institutional Repository

# PC-3細胞の圧迫変形損傷に及ぼす温度の影響

高松, 洋 九州大学機能物質科学研究所

**熊谷, 紀彦** 三井化学株式会社

本田, 博司 九州大学機能物質科学研究所

https://doi.org/10.15017/7921

出版情報:九州大学機能物質科学研究所報告.14(2), pp.105-109, 2000-12-25.九州大学機能物質科学 研究所 バージョン: 権利関係:

# PC-3 細胞の圧迫変形損傷に及ぼす温度の影響

高松 洋・熊谷紀彦\*・本田博司

### Effect of Temperature on the Destruction of PC-3 Cells by Deformation

## Hiroshi TAKAMATSU, Norihiko KUMAGAE and Hiroshi HONDA

Recent studies show that during slow freezing of cells, in addition to damage by so-called solution effect, the cells may be also injured by mechanical damage induced by ice crystal compression. A new experimental procedure was employed to develop a quantitative understanding of cell destruction by deformation with two parallel surfaces. The viability of deformed cells (prostatic carcinoma cell line PC-3) was measured at 0 °C, 23 °C and 37 °C, and six different nominal gaps between 32.3  $\mu$ m and 3.5  $\mu$ m. The relation between measured viability and gap size for 0 °C and 23 °C are identical. This may suggest that deformation damage is not related to the mechanical properties of the lipid membrane but the deformation of the cytoskelton.

### 1.緒 言

生体の凍結技術は、血液や精子、あるいは研究用に株 化された細胞などの凍結保存では既に実用化されている。 凍結保存が可能かどうかは細胞の種類に依存しており、 また、凍結保存されているのは凍結解凍後の生存率がさ ほど高くなくても実用上は問題ない場合が多い。しかし、 未だに技術が確立されていない細胞や組織、臓器に加え て、今後は、再生医学(Tissue Engineering)の進歩とと もに人工臓器やそれに用いる細胞の凍結保存の需要が高 まると考えられ、その場合には、種々の細胞を高い生存 率で凍結保存することが必要になる。そのためには、細 胞が凍結解凍によりどのようなメカニズムで障害を被る かという科学的知見をもとに、それを回避する方法を見 いだすことが重要である。

生体が凍結により何故、どの程度、どのように損傷を 受けるかについては低温生物学の分野で研究が進められ てきた。そして、熱的パラメータである冷却速度に依存 する二つの細胞損傷のメカニズムが提案されている。一 つは、高い冷却速度(急速冷却)の場合に生ずる細胞内 凍結であり、細胞内の氷晶により細胞膜や細胞内小器官 が損傷を受ける。もう一つは低い冷却速度(緩速冷却)

受理日 2000年10月24日

\* 三井化学(株)

の場合の細胞の脱水収縮である。緩速冷却の場合には、 細胞外での凍結の結果、液中の電解質濃度が上昇するた め細胞内外に浸透圧差が生じ、結果として細胞が脱水収 縮する。これが「溶液効果」と呼ばれるもので、細胞液 の濃縮による化学的効果(1),(2)、または、脱水による体積変 化(3).(4)が細胞損傷の直接的主要因であると考えられてき た。しかし、それ以外のメカニズムの可能性も指摘され ている。Nei<sup>(5)</sup>は細胞が氷晶のあいだに閉じこめられてい る観察結果から機械的ストレスも損傷要因であると推測 した。また、Mazur らの研究グループ(6).(7).(8)は細胞の生存 率が細胞懸濁液の未凍結部分の割合に依存することを示 し、氷晶によるせん断力や変形による損傷メカニズムを 提案した。最近では、Ishiguro-Rubinsky<sup>(9)</sup>が血液細胞を用 いた実験を行い、細胞の損傷が氷晶の形態に依存するこ とを明らかにしている。これらの研究は、すべて氷晶に よる機械的ストレスが細胞損傷の原因であることを示唆 しているが、変形による細胞の損傷に関して有用な情報 を与える報告は全くない。細胞膜の機械的性質、すなわ ち応力と歪みの関係に関しては、血管内のレオロジーへ の適用を目的とした血球の研究(10)およびウニの卵を用い た細胞の分裂過程の研究(1)があるに過ぎない。そこで、 著者らは細胞の変形が損傷に及ぼす影響を定量的に明ら かにする実験法を考案し、平行な二平面で挟まれた細胞 の生存率と変形度の関係を明らかにした(12)。ここでは、 実験装置と方法に改良を加え、細胞の変形限界に及ぼす 温度の影響を明らかにした結果について報告する。

### 2. 試料および実験方法

実験には、ヒト由来の前立腺癌細胞株 PC-3(13)を用い、 リン酸緩衝生理食塩水 (Dulbecco's phosphate buffered saline, DPBS, GIBCO BRL) による懸濁液を実験試料とし た。実験方法の概要は以下のとおりである。まず、遊離 細胞と予め粒径の判っているガラスビーズが適量入って いる DPBS 懸濁液を用意する。この懸濁液に色素排除試験 用のトリパンブルー水溶液 (GIBCO BRL) を混ぜ (最終 濃度0.2%)、その液滴をカバーガラスの上に置く。その 上にスライドガラスを押しつけ懸濁液すなわち細胞を押 しつぶす。次にこのスライドガラスを顕微鏡下(Nikon E600) に置き、観察像をディジタルカメラ (Nikon COOLPIX 910) で撮影する。そして、この操作を径の異 なるガラスビーズについて繰り返す。この「サンドイッ チ法|ではガラスビーズがスライドガラスとカバーガラ スの間のスペーサになり二平面の間隔を決めるので、そ の直径が正確にわかっていれば細胞の変形の程度を知る ことができる。実験では、粒径の異なる#1~#6(呼称) のビーズ (Duke Scientific Co.) を用いた。それぞれの平 均径は以下のとおりである。#1:2.5±0.5µm(標準偏差 SD 1.0 $\mu$ m) = #2 : 5.1 ±0.5 $\mu$ m (SD 0.8 $\mu$ m) = #3 : 7.8 ±  $0.8\mu m (SD 1.0 \mu m)$ , #4:10.4±1.0µm (SD 1.0µm),  $\#5: 14.5 \pm 1.0 \mu m$  (SD 1.7 $\mu m$ )  $\#6: 30.2 \pm 2.1 \mu m$  (SD 1.8µm)。細胞は後述のように平均直径が約17.5µmのほ ぼ球形であるので、#6のビーズを用いた場合には細胞は 圧迫されない。Fig.1に実験装置の概略を示す。細胞を押 しつぶす操作は、二枚のガラスが平行を維持したまま上 下するメカニカルステージを用いて行った。また、この 装置では温度調節ステージにより両方のガラス板とも一 定の温度に保つことができる。顕微鏡のステージも温度 調節が可能であり、変形の操作と観察のいずれも所望の 温度環境下で行った。顕微鏡観察は 10x 対物レンズを用 いて行った。同一視野に対して明視野像および位相差像 を記録し、スライドガラスを規則的に動かして 7~12 箇 所の画像を記録した。実験は粒径の大きい順に行い、最 初と最後に#6のビーズまたは血球計算盤(ビルケルチュ ルク)を用いてコントロールの生存率を測定した。一種 類のビーズを用いた実験の所要時間は最長でも10分、一 連の実験(ーラン)の合計所要時間は約1時間であった。 細胞の生存率の計算は、記録した画像を実験終了後に

細胞の生存率の計算は、記録した画像を実験於了後に コンピュータに取り込み、細胞数を計数することにより 行った。細胞の生死は色素排除試験の方法で判定した。 この方法では、細胞膜の機能が保持されている細胞は透 明なままであり、死んだ細胞はトリパンブルーにより青 く染色される。細胞の総数は位相差像より、染色された 細胞数は明視野像より計数した。

実験は0℃、23℃、37℃で行った。また、0℃での実験

中の結露を防ぐため、すべての操作を乾燥空気で満たしたボックス中で行った。37℃での実験の場合には、液の 蒸発による濃縮を防ぐため、カバーガラスの周辺部をオ イルでシールした。



				(a)	T = 0 °C					
Run No.	#1 (3.5 µm)		#2 (5.9 μm)		#3 (8.8 μm)		#4 (11.4 μm)		#4 (16.2 μm)	
	n	Viability	n	viability	n	viability	n	viability	n	viability
1	1238	5.9 %	1585	57.0 %	1406	69.7 %	1816	88.2 %	1800	95.7 %
2	1338	10.3	1881	53.2	1717	80.9	1753	92.7	1908	97.4
3	601	15.2	963	52.4	1210	81.6	1175	88.3	1448	95.6
4	472	20.2	574	49.5	609	82.7	746	94.2	1062	101.6
5	583	10.4	495	46.7	647	80.5	743	88.2	897	96.2
6	807	23.2	503	49.1	517	80.4	552	85.1	810	95.2
Mean		14.2		51.3		79.3		89.4		96.9
SD		6.1		3.6		4.8		3.4	•	2.4
				(b) 2	r=23°	5				1.1
Run No.	#1 (3.5 μm)		#2 (5.9 μm)		#3 (8.8 μm)		#4 (11.4 μm)		#4 (16.2 μm)	
	n	viability	n	viability	<u>n</u>	viability	n	viability	n	viability
1	1843	8.8 %	1594	59.0 %	1665	79.6 %	1722	95.3 %		
2	1438	9.0	1896	54.3	1306	70.3	2370	80.1	1341	90.9 %
3	1022	13.6	1038	55.3	1968	79.3	1061	80.9	1546	94.9
4	1077	15.6	1034	52.9	1371	79.5	1872	87.1	1658	98.7
5	1366	7.2	1462	36.9	1331	68.0	1533	87.0		
6	242	10.8	249	43.5	328	60.5	322	76.4	317	91.9
7	322	24.0	196	55.5	529	66.1	581	81.4	512	93.9
8	409	19.1	404	43.2	426	77.3	596	90.9	600	91.8
9	405	16.1	606	50.3	436	77.1	408	81.8	531	99.4
Mean		13.8		50.4		73.1		84.5		94.4
SD		5.5		7.4		7.1		6.0		3.6
				(c) 7	r=37℃	;				
Run No.	#1 (3.5 µm)		#2 (5.9 μm)		#3 (8.8 μm)		#4 (11.4 μm)		#4 (16.2 μm)	
	n	viability	n	viability	n	viability	n	viability	n	viability
1	1072	1.6 %	1408	3.7 %	1423	61.0 %	1822	83.3 %		
2	1378	1.4	1470	17.4	1408	50.9	1380	78.5	1077	90.9 %
3	1096	0.1	1083	36.0	1173	57.0	1324	83.8		
4	1057	12.3	1116	32.0	1789	63.3	2368	66.4	2371	89.3
5	1030	4.6	1905	13.2	2368	34.5	1507	76.9	1411	92.7
6	1754	10.4	1770	20.0	2784	53.4	1618	75.6	1943	92.4
7	380	20.9	380	38.0	340	74.2	385	81.5	500	85.8
8	1027	11.8	754	37.5	819	85.7	872	95.9	1249	95.7
9	644	9.8	616	30.7	746	48.6	825	71.7	757	88.3
Mean		8.1		25.4		58.7		79.3		90.7
SD		6.8		12.3		14.9		8.4		3.2

## Table 1 Normalized viability of deformed cells $(x) T = 0^{\infty}$

### 3. 実験結果

Fig. 2 に細胞の平均直径の度数分布を示す。これは、#6 のビーズと最終濃度 0.2%のトリパンブルーの入った細胞 懸濁液を 40x 対物レンズを用いて記録した 150 画像から 得たものであり、合計 1460 個の生きている細胞(透明な 細胞)の長径と短径の平均値に対する結果である。なお、 この場合の顕微鏡の分解能は約 0.45µm である。測定の結 果、平均直径は 17.5µm、標準偏差は 2.8µm であった。ま た、短径と長径の比は細胞の 84%が 0.7 以上であり、ほ ほ球形とみなすことができる。

生存率のデータは一度の実験で各隙間に対して一つ求 めた。これは、各条件で記録した 7~12 箇所の画像から 計数した生細胞と死細胞の総数より求めた。計数した細 胞総数は一条件につき 242~2784 個であった (Table 1 参 照)。各ランの実験の最初と最後に行ったコントロール に対する記録画像 (5~10箇所)からも、細胞数を合計し て同様に生存率をそれぞれ求めた。実験前後のコントロ ールの生存率の差は最大で約4%であり、t-検定の結果、 有意差はなかった(棄却域p<0.05)。コントロールの生 存率をこの二つの値の平均値で定義し、各隙間に対する 生存率の測定値をコントロールの生存率で規格化した。 なお、全ての実験でコントロールの生存率は83%以上で あった。

Table 1 に各ランごとの実験結果を示す。表中の値は規 格化した生存率およびそれぞれの条件で計数した細胞の 総個数 n を表す。また、Mean とは 6~9 回の実験結果の 平均値、SD は標準偏差である。

Fig. 3 は生存率の平均値と隙間の関係を、温度をパラメ ータとして示している。縦のエラーバーは標準偏差を表 す。隙間の大きさは、その間に挟まれたビーズのうち大 きいもので決まるので、各ビーズの平均値と標準偏差と の和に等しいと仮定し、小さい順に3.5µm、5.9µm、8.8µm、 11.4µm、16.2µmであるとした。横方向のエラーバーは、

ビーズ直径の標準偏差を示している。細胞の生存率は隙 間の減少すなわち圧迫変形とともに減少する。23℃の場 合、隙間 11.4μm では約 85%が生存しているが、5.9μm では半数の細胞が損傷を受け、3.5µm になると約 90%が 破壊される。この結果は別の前立腺細胞株 ND-1 を用いた 常温での結果(12)とほぼ一致する。また、0℃の場合も23℃ の結果とほぼ一致している。これに対して、37℃では生 存率は0℃および 23℃の場合より低く、特に 5.9um およ び 8.8µm でその差が大きい。したがって、37℃の場合に は 0℃および 23℃の場合より細胞が耐えうる変形の程度 が小さい。なお、各隙間におけるデータの分散分析 (ANOVA)の結果、いずれの隙間においても0℃と23℃ には有意差がなかった(p>0.08)。これに対して、図中 に\*\*で示している 5.9µm、8.8µm の場合には 37℃のデー タと0℃および 23℃の両方のデータの間に有意差があり、 \*で示している11.4µm、16.2µmの場合には、37℃のデー タと0℃のデータの間に有意差が認められた(p<0.02)。 また、二元配置分散分析と多重比較検定 (Two-way ANOVA and Post hoc tests) の結果でも37℃のデータと0℃または 23℃のデータの間には有意差が認められた(p<0.0001)。

### 4.考察

Fig. 3 の結果は、0℃および23℃の場合には、細胞が元 の直径の 30%まで圧迫されると約 50%が損傷し、元の 20%まで圧迫されると約 90%の細胞が損傷することを示 している。変形した細胞の縦断面において細胞外溶液と 接する表面が半円であると仮定すると、細胞の体積が不 変であるという条件から隙間と細胞表面積の関係を求め ることができる。それによると、上記の変形により、表 面積がそれぞれ 50%および 100%増加することになる。細 胞膜を構成する脂質二重膜は、わずか数%の伸張で破壊さ れると言われているが<sup>(14)</sup>、本実験によると細胞の損傷を



Fig. 3 Effect of gap size on viability

招く面積増加はこれよりはるかに大きい。したがって、 このように大きな面積増加を伴う変形に耐えられるのは、 細胞表面に存在する微絨毛やしわ(13)の形で細胞膜が蓄え られているからだと考えられる。Wolfe-Steponkus<sup>(15)</sup>はラ イ麦のプロトプラストをマイクロピペットで吸引する実 験を行い、細胞膜の機械的性質について調べている。そ の結果によると、細胞の表面積の拡大限界は平均で約 20%である。この値は本研究の値より小さいが、これは、 拡張できる面積の限界が細胞の種類により異なるためと 考えられる。また、彼らは、表面積の急激な増加により 細胞膜が弾性的挙動を示した後、時間経過とともに表面 の張力が低下していくことを明らかにした。そして、細 胞膜を構成する物質がリザーバから細胞膜へ供給される ことによりこのような現象が生ずるという仮説を提案し ている。この物質移動は数分のオーダーのものであり、 ほぼ瞬間的に変形する本実験ではこのような物質交換の 余地はないと思われる。しかし、変形速度または表面積 の拡張速度が生存率にどう影響を及ぼすかという点は今 後の課題の一つである。このような細胞の変形限界に関 する問題は、凍結への応用だけでなく、細胞生物学の基 本的な問題として重要な問題と考えられる。

細胞の生存率と変形度の関係が 0℃と 23℃で一致する という本実験で得られた結果は大変興味深い。動物細胞 の場合、細胞膜を構成する脂質の相転移温度は 10℃から 20℃の間にあるのが一般的である<sup>(16)</sup>。したがって、0℃は 相転移温度より低く、23℃はそれより高いと考えられる。 よって、本研究の結果は、細胞の損傷が脂質の性質、す なわち細胞膜の機械的性質で決定されるのではないこと を示唆している。一方、37℃では生存率が低いという実 験結果も興味深い。細胞を#6 のビーズを用いて圧迫のな い状態で保持する事前の実験によると、0℃と 37℃のいず れの温度においてもトリパンブルーで染色される細胞の 個数が、少なくとも 20分までは時間の経過に依存せずほ ほ一定であった。したがって、37℃における生存率低下 の原因は、酸素や栄養の供給がない状態に通常の代謝状 態で放置されるためではない。以上のことから、細胞の 損傷は細胞内骨格の変形に起因し、変形限界は、例えば 細胞膜と細胞骨格の接着の強さに依存するのではないか と考えられる。しかし、細胞の変形限界については、さ らに実験を重ねて検討を続けていく必要がある。

### 5. 結 言

細胞を凍結させる際に、細胞が氷晶による機械的スト レスにより損傷するメカニズムを明らかにすることを目 的として、二つの平行な平面で挟まれ変形する細胞の生 存率と隙間の関係を実験的に求めた。また、生存率に及 ぼす温度の影響についても検討した。その結果、細胞が 元の直径の20%まで圧迫され、見かけの表面積が約2倍 になると、ほぼ完全に損傷することが明らかになった。 また、生存率と隙間の関係は、細胞膜の脂質の相転移温 度を挟む0℃と23℃ではほぼ一致するが、37℃では変形 に耐える細胞の割合が減少することがわかった。現在の ところ、この原因は明らかではないが、細胞の変形損傷 は、細胞膜の機械的性質に依存するのではなく、細胞骨 格の変形に起因している可能性がある。

最後に細胞の継代培養についてご指導ご協力いただい た九州大学大学院医学研究院の内藤誠二教授および住本 英樹教授に謝意を表す。また、本研究は、平成11~12年 度文部省科学研究費補助金(基盤研究(C)(一般))およ び九州大学機能物質科学研究所リーダーシップ支援経費 (平成11年度)の援助を受けた。ここに記して謝意を表 す。

### 文 献

- Lovelock, J. E., "The Haemolysis of Human Red Blood-Cells by Freezing and Thawing," *Biochimica et Biophysica Acta*, 10 (1953), pp. 414-426.
- Pegg, D. E. and Diaper, M. P., "The Unfrozen Factor Hypothesis of Freezing Injury to Human Erythrocytes: A Critical Examination of Evidence," *Cryobiology*, 26 (1989), pp. 30-38.
- Meryman, H. T., "Osmotic Stress as a Mechanism of Freezing Injury," Cryobiology, 8 (1971), pp. 489-500.
- Steponkus, P. L. and Gordon-Kamm, W. J., "Cryoinjury of Isolated Protoplasts: A Consequence of Dehydration or the Fraction of Suspended Medium That is Frozen," Cryo-Letters, 6 (1985), pp. 217-226.
- 5) Nei, T., "Mechanism of Hemolysis of Erythrocytes by Freezing at Near-Zero Temperatures. II. Investigations

of Factors Affecting Hemolysis by Freezing," Cryobiology, 4 (1967), pp. 303-308.

- Mazur P., Rall, W. F., and Rigopoulos, N., "Relative Contributions of the Fraction of Unfrozen Water and of Salt Concentration to the Survival of Slowly Frozen Human Erythrocytes," *Biophysical Journal*, 36 (1981), pp. 653-665.
- Mazur, P. and Rigopoulos, N., "Contributions of Unfrozen Fraction and of Salt Concentration to the Survival of Slowly Frozen Human Erythrocytes: Influence of Warming Rates," *Cryobiology*, 20 (1983), pp. 274-289.
- Mazur, P. and Cole, K. W., "Roles of Unfrozen Fraction, Salt Concentration and Changes in Cell Volume in the Survival of Frozen Human Erythrocytes, " Cryobiology, 26 (1989), pp. 1-29.
- Ishiguro, H. and Rubinsky, B., "Mechanical Interactions between Ice Crystals and Red Blood Cells during Directional Solidification," *Cryobiology*, 31 (1994), pp. 483-500.
- Evans, E. A. and Skalak, R., "Mechanics and Thermodynamics of Membranes," CRC Press, Florida (1980).
- Hiramoto, Y., "Mechanical Properties of Sea Urchin Eggs," *Experimental Cell Research*, **32** (1963), pp. 59-75.
- 12) Takamatsu, H. and Rubinsky, B., "Viability of Deformed Cells," Cryobiology, 39 (1999), pp. 243-251.
- Kaighn, M. E., Narayan, K. S., Ohnuki, Y., Lechner, J. F. and Jones, L. W., "Establishment and Characterization of a Human Prostatic Carcinoma Cell Line (PC-3)," *Investigative Urology*, **17** (1979), pp. 16-23.
- Bloom, M., Evans, E. and Mouritsen, O. G., "Physical Properties of the Fluid Lipid-Bilayer Component of Cell Membranes: A Perspective," *Quarterly Review of Biophysics*, 24 (1991), pp. 293-397.
- 15) Wolfe, J. and Steponkus, P. L., "Mechanical Properties of the Plasma Membrane of Isolated Plant Protoplasts," *Plant Physiology*, **71** (1983), pp. 276-285.
- 16) Crowe, J. H., Tablin, F., Tsvetkova, N. and Oliver, A. E., "Are Lipid Transitions Responsible for Chilling Damage in Human Platelets?" *Cryobiology*, 38 (1999), pp. 180-191.