

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 μm and 3.5 μm. 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 cytoskeleton.

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)

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效果^{(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な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⁽⁵⁾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⁽⁹⁾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⁽¹¹⁾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。

受理日 2000年10月24日

* 三井化学 (株)

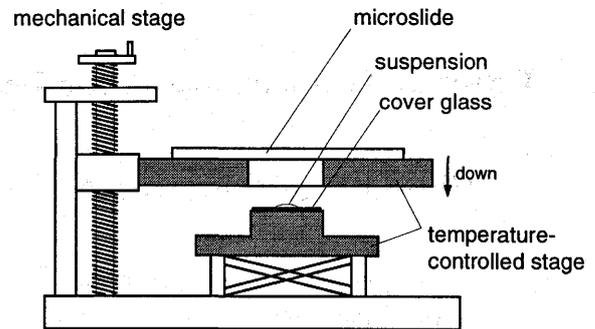
2. 試料および実験方法

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: $2.5 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (標準偏差 SD $1.0 \mu\text{m}$)、#2: $5.1 \pm 0.5 \mu\text{m}$ (SD $0.8 \mu\text{m}$)、#3: $7.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$ (SD $1.0 \mu\text{m}$)、#4: $10.4 \pm 1.0 \mu\text{m}$ (SD $1.0 \mu\text{m}$)、#5: $14.5 \pm 1.0 \mu\text{m}$ (SD $1.7 \mu\text{m}$) #6: $30.2 \pm 2.1 \mu\text{m}$ (SD $1.8 \mu\text{m}$)。細胞は後述のように平均直径が約 $17.5 \mu\text{m}$ 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 (一ラン) の合計所要時間は約 1 時間であった。

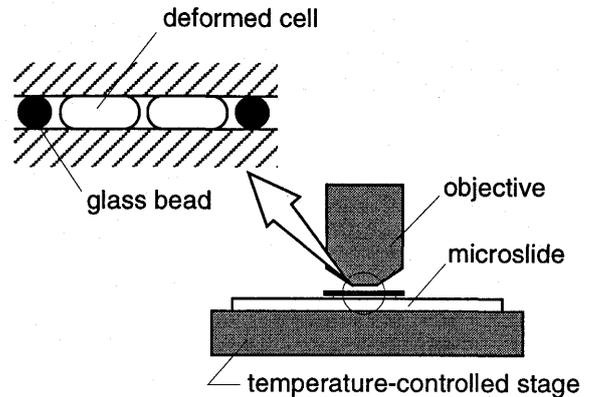
細胞の生存率の計算は、記録した画像を実験終了後にコンピュータに取り込み、細胞数を計数することにより行った。細胞の生死は色素排除試験の方法で判定した。この方法では、細胞膜の機能が保持されている細胞は透明なままであり、死んだ細胞はトリパンブルーにより青く染色される。細胞の総数は位相差像より、染色された細胞数は明視野像より計数した。

実験は 0°C、23°C、37°C で行った。また、0°C 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°C 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) Mechanical stage



(b) Close-up view of specimen

Fig. 1 Experimental apparatus

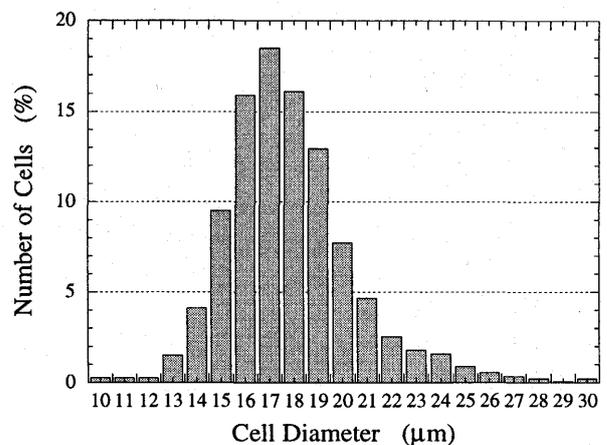


Fig. 2 Distribution of cell diameters

Table 1 Normalized viability of deformed cells

(a) $T=0^{\circ}\text{C}$

Run No.	#1 (3.5 μm)		#2 (5.9 μm)		#3 (8.8 μm)		#4 (11.4 μm)		#4 (16.2 μm)	
	<i>n</i>	Viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	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) $T=23^{\circ}\text{C}$

Run No.	#1 (3.5 μm)		#2 (5.9 μm)		#3 (8.8 μm)		#4 (11.4 μm)		#4 (16.2 μm)	
	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	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) $T=37^{\circ}\text{C}$

Run No.	#1 (3.5 μm)		#2 (5.9 μm)		#3 (8.8 μm)		#4 (11.4 μm)		#4 (16.2 μm)	
	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	viability	<i>n</i>	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

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 0.45 μm である。測定の結果、平均直径は 17.5 μm 、標準偏差は 2.8 μm 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、ほぼ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、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 $3.5\mu\text{m}$ 、 $5.9\mu\text{m}$ 、 $8.8\mu\text{m}$ 、 $11.4\mu\text{m}$ 、 $16.2\mu\text{m}$ 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 $11.4\mu\text{m}$ では約 85%が生きているが、 $5.9\mu\text{m}$ では半数の細胞が損傷を受け、 $3.5\mu\text{m}$ 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⁾とはほぼ一致する。また、0℃の場合も 23℃の結果とはほぼ一致している。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 $5.9\mu\text{m}$ および $8.8\mu\text{m}$ 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 $5.9\mu\text{m}$ 、 $8.8\mu\text{m}$ の場合には 37℃のデータと 0℃および 23℃の両方のデータ間に有意差があり、*で示している $11.4\mu\text{m}$ 、 $16.2\mu\text{m}$ の場合には、37℃のデータと 0℃のデータ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⁽¹⁴⁾、本実験によると細胞の損傷を

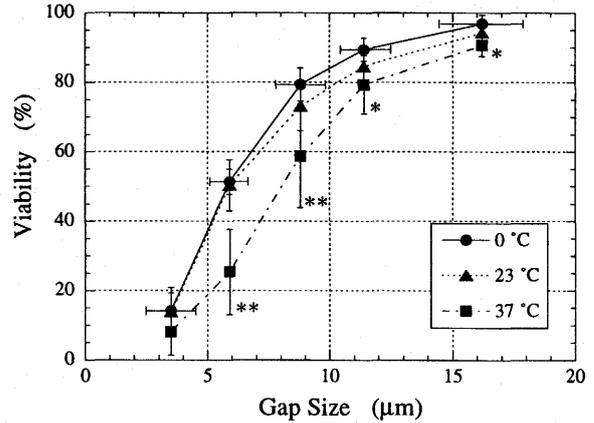


Fig. 3 Effect of gap size on viability

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⁽¹⁵⁾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ふ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⁽¹⁶⁾。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

ば一定であった。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

- 1) Lovelock, J. E., "The Haemolysis of Human Red Blood-Cells by Freezing and Thawing," *Biochimica et Biophysica Acta*, **10** (1953), pp. 414-426.
- 2) 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.
- 3) Meryman, H. T., "Osmotic Stress as a Mechanism of Freezing Injury," *Cryobiology*, **8** (1971), pp. 489-500.
- 4) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Ishiguro, H. and Rubinsky, B., "Mechanical Interactions between Ice Crystals and Red Blood Cells during Directional Solidification," *Cryobiology*, **31** (1994), pp. 483-500.
- 10) Evans, E. A. and Skalak, R., "Mechanics and Thermodynamics of Membranes," CRC Press, Florida (1980).
- 11) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.