

微小摩擦刺激が血管内皮細胞表面の糖鎖構造の摩耗に及ぼす影響

The effects of nano-friction stimulation on the wear of endothelial glycocalyx layer

東理大・工(学) *賀東 春人 東理大・工(正) 佐藤 魁星 東理大・工(正) 佐々木 信也

Haruto Goto*, Kaisei Sato*, Shinya Sasaki**

*Graduate school of Tokyo University of Science, **Tokyo University of Science

1. 緒言

血管内皮細胞 (Endothelial cell : EC) は血管壁の最内腔を一層で覆うように存在する紡錘形の細胞である。EC 最表面は、ヘパリン酸やヒアルロン酸を主成分とした血管内皮グリコカリックス層 (Endothelial glycocalyx layer : EGL) に覆われている。近年、EGL の構造や機能に着目した研究から、EGL は血液中分子と血管内皮細胞表面の相互作用を調節することで血栓の形成を防止し、血管の恒常性を保つ仕組みを持つことが明らかとなってきた¹⁾。一方、カテーテル手術により血管内壁に外的な物理刺激が加わるような場合において、血管疾患が発症することが報告されている。これは、カテーテルによって生じる摩擦刺激により、数百 nm オーダーの EC 最表面が損傷を受けるためと考えられているが、そのメカニズムに関しては十分な調査は行われていない。

本研究では、EC の表面損傷に及ぼす摩擦刺激の影響を明らかにすることを目的に、原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscope : AFM)を用い、摩擦前後の EC 表面の界面構造の変化を測定した。摩擦刺激は、AFM 探針の直接接触によって与え、フォースカーブ測定により、EC の界面構造を調査した。

2. 実験概要

EC 試料に、ウシ大動脈血管内皮細胞 (JCRB Cell Bank, JP) を用いた。EC 界面構造の測定には、AFM (SPM-8100FM, SHIMADZU, JP) を用い、コンタクトモード測定とフォースカーブ測定を行った。コンタクトモード測定により細胞表面に摩擦刺激を加え、摩擦前後にフォースカーブ測定を行うことで、EC 表面高さ方向の界面構造を調査した。AFM 測定には、チップレスカンチレバー先端に直径 6 μm のポリスチレン球を取り付けた試作カンチレバーを使用した。測定条件を Table 1 に示す。荷重負荷は 1.2 nN と 0.7 nN、しゅう動回数は 5 回と 15 回の 3 条件で試験を実施した。

Table 1 Friction tests conditions (Vertical load)

Temperature	°C	37		
Vertical load	nN	1.2	0.7	1.2
Cycle number	-	5	5	15
Scan speed	Hz	15		

3. 実験結果・考察

Figure 1 ならびに Fig. 2 に、垂直荷重 1.2 nN ならびに垂直荷重 0.7 nN における摩擦刺激前後の ZX 画像を示す。垂直荷重 1.2 nN の場合は、界面構造の厚さが 558 nm から 320 nm に変化し、垂直荷重 0.7 nN の場合は、621 nm から 558 nm に変化した。また、垂直荷重 1.2 nN / 0.7 nN における界面構造厚さの減少量は、それぞれ 158 nm/63 nm であった。

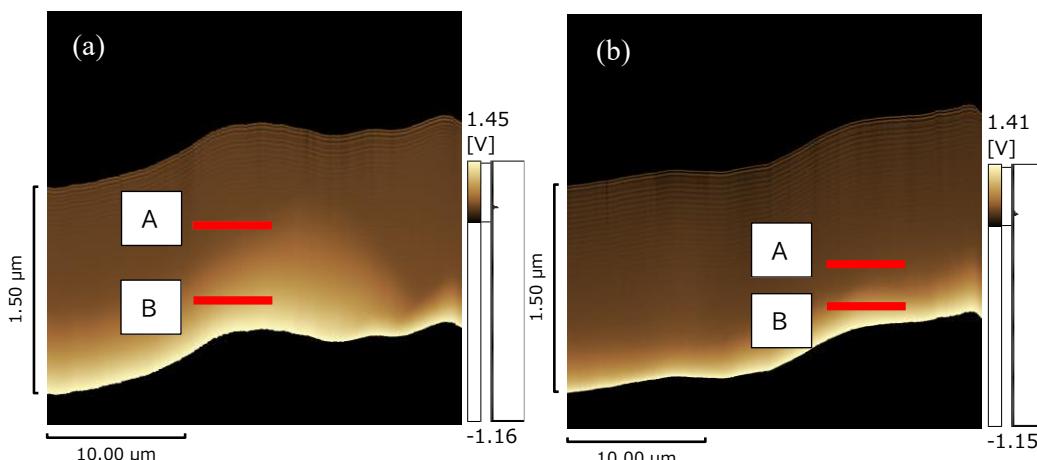


Fig. 1 ZX image of the cell (a) before and (b) after friction at a load of 0.7 nN.

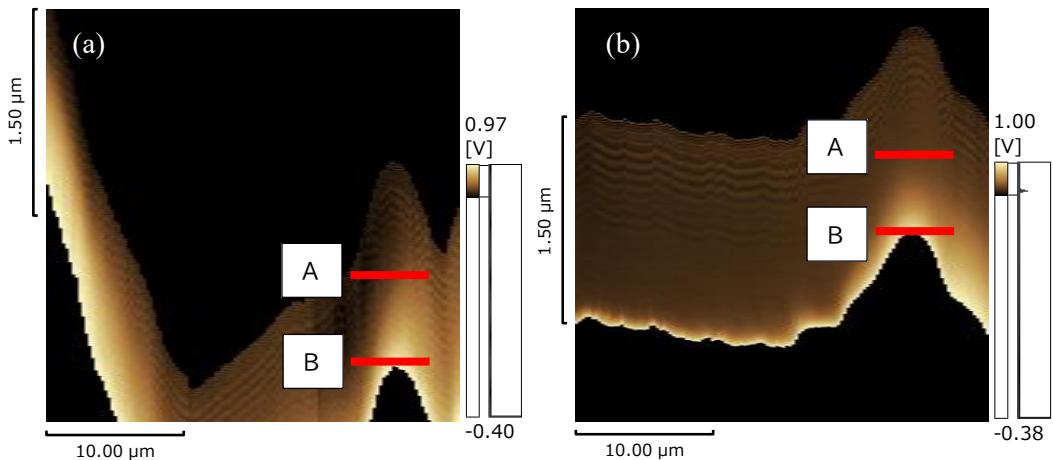


Fig. 2 ZX image of the cell (a) before and (b) after friction at a load of 0.7 nN.

Figure 3 に、しゅう動回数に対する界面構造の厚さを示す。0~5 cycle, 5~10 cycle ではそれぞれ約 150 nm の減少が確認された。一方で、10~15 cycle では、顕著な減少が確認されなかった。また、15 cycle 合計で 400 nm の減少が確認された。

4. 考察

今回の実験では、垂直荷重 0.7 nN の場合、界面構造厚さの減少量は、垂直荷重が 1.2 nN の場合と比較して、59% 斥力領域の減少が小さくなることが確認された。

しゅう動に伴う界面構造厚さの減少量は、10 cycle までは顕著である一方で、その後は、小さいことが確認された。EGL は 0.02 ~ 1 μm の厚さを持つ構造体と考えられていることから²⁾、界面構造厚さの減少量は EGL の厚さと近いオーダーであると考える。

以上より、ZX 画像において観察される界面構造は、EGL であると考えられ、微小な摩擦刺激によって EGL が摩耗したものと推察される。EGL の摩耗は、直接接触時の垂直荷重ならびにしゅう動回数の減少によって抑制できることは、カテーテル手術後の血管疾患発生の予防に指針を与えるものと思われる。

5. 結言

摩擦刺激による血管内皮細胞表面の界面構造への影響を調査するため、AFM を用いて、摩擦刺激前後の高さ方向の表面構造変化を調査し、以下の知見を得た。

- (1) AFM コンタクトモードにより摩擦刺激を加え、フォースカーブ測定により摩擦前後の界面構造変化を調べた結果、細胞表面の界面構造は荷重が大きいほど減少することが確認された。
- (2) 界面構造の減少量は、1~10 cycle までの初期に顕著な減少が確認された一方で、400 nm 減少したあとは、摩擦刺激を加えても界面構造の減少は確認されなかった。

謝辞

本研究を実施するにあたりご協力を頂いた京都大学工学研究科特定助教の山下直輝氏ならびに株式会社島津テクノリサーチの小暮亮雅氏に謝意を表します。

文献

- 1) T. Iba, et al, Derangement of the endothelial glycocalyx in sepsis, Journal of Thrombosis and Haemostasis, 17, (2019) 283-294.
- 2) 中島芳樹, "血管内皮におけるグリコカリックスとその保護", 臨床麻酔, 40, (2016) 711-720.

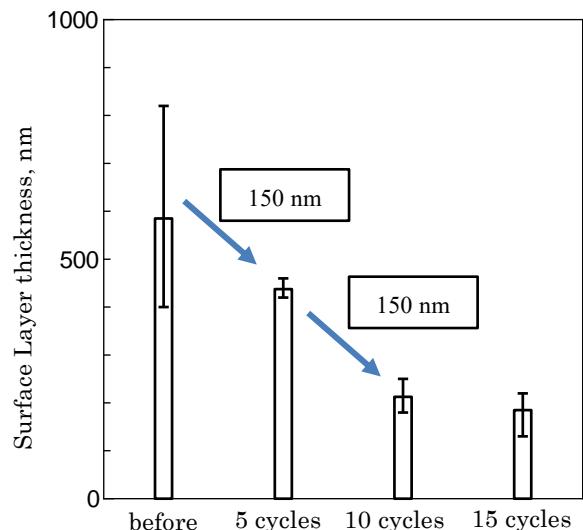


Fig. 3 Surface Layer thickness per cycles