

摩擦刺激が血管内皮グリコカリックス層に及ぼす影響

Effects of frictional stimulation on 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 Gato*, Kaisei Sato*, Shinya Sasaki**

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

1. 緒言

カテーテル手術は、心筋梗塞や大動脈瘤といった重篤な疾患への低侵襲な治療法として幅広く利用されている¹⁾。その一方で術後にまれに血栓症等の合併症が発生することが報告されており²⁾、合併症リスク低減が求められている。合併症の発生の要因の1つとして挙げられるのが、カテーテルと接触によって生じる血管壁への摩擦刺激である³⁾。血管壁は、3膜で構成されその最内腔は血管内皮細胞（Endothelial cell: EC）によって覆われている。また、EC表面には、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）が存在する。カテーテル手術中では、EC表面のEGLに対して、カテーテルが直接接触することによって外的な摩擦刺激が作用しており、その摩擦刺激が、ECの損傷に影響を与えていると考えられる。この損傷がカテーテル手術後の合併症発生と関連があると考えられ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、摩擦刺激がEGLに及ぼす影響を明らかにすることを目的に、周波数変調原子間力顕微鏡（Frequency-modulation atomic force microscope: FM-AFM）を用い、ヒアルロニダーゼ処理前後のEC表面の観察結果ならびにAFMコンタクトモードによって行ったECの摩擦試験結果について報告する。

2. 実験方法

2.1 実験試料

本実験では、ウシ大動脈内皮細胞を用いた。Figure 1に光学顕微鏡で撮影した細胞の形状像を示す。細胞密度が約90%のコンフルエント達するまで継代し実験に使用した。すべての実験は、培養に使用した培地と同じ培養液中で37℃に保ち実施した。Table 1に細胞培養および実験に使用した試料と試薬を示す。

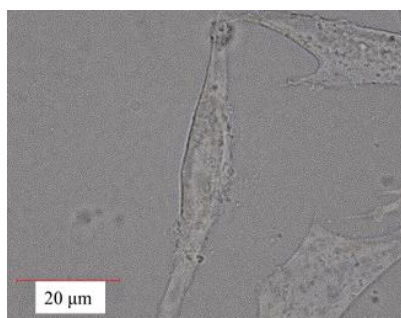


Fig.1 Optical image of a cell

Table 1 Details of the experimental samples

Cells	NM-1	JCRB Cell Bank
Culture dishes	Multi culture dish	VWR
Culture solution	DMEM	Thermo Fisher
FBS	Fetal Bovine Serum	Thermo Fisher
Antibiotics	Antibiotic-Antimycotic	Thermo Fisher

2.2 FM-AFM 測定

血管内皮細胞の界面構造観察には、FM-AFM（SPM-8100FM, SHIMADZU, JP）を使用し、細胞表面の深さ方向に対する斥力領域分布を取得した。カンチレバーにはシリコン製カンチレバー（PPP-NCSTAuD, ばね定数 C: 11 N/m, 共振周波数 f: 78-80 kHz）を使用した。ヒアルロン酸はEGLの主成分の1つであり、ヒアルロニダーゼ処理を行うことで酵素除去することができ⁴⁾、EGLの除去を模擬することができる。今回の実験では、ヒアルロニダーゼ処理前後の細胞に対してFM-AFM測定を実施した。

2.3 AFM 摩擦試験

AFMコンタクトモード測定（SPM-8100FM, SHIMADZU, JP）を用いて細胞の摩擦試験を行った。カンチレバーには、直径 6 μm のポリスチレン球をチップレスカンチレバーの先端に取り付けた自作のコロイダルカンチレバー（ばね定数 0.04 N/m）を使用した。Table 2にコンタクトモードによる摩擦条件を示す。

Table 2 Friction tests conditions

Temperature	[°C]	37
Cycle number	[-]	20
Scan speed	[Hz]	5
Contact pressure	[kPa]	0.4
Scan range (X×Y)	[μm]	30×30

3. 実験結果

3.1 FM-AFM 測定

Figure 2に培養液中で測定を行ったヒアルロニダーゼ処理前後の血管内皮細胞のZ-X面における斥力領域を示す。ヒアルロニダーゼ処理前では、数百 nm オーダの弱い界面構造が確認された一方で、処理後では斥力が単一に増加しており、同様の界面構造が失われている様子を確認した。

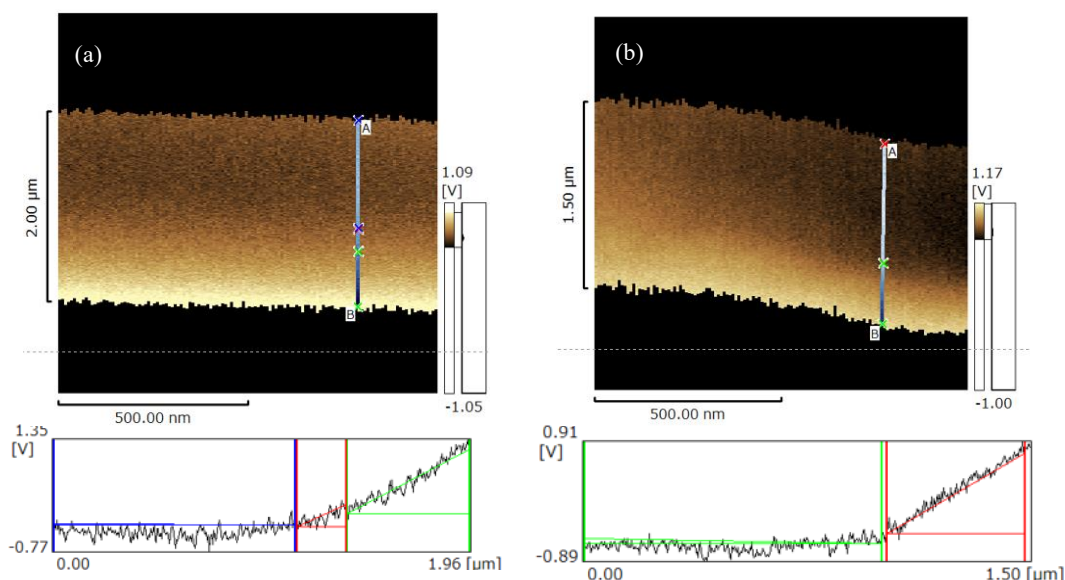


Fig. 2 ZX measurement of the cells (a) before and (b) after hyaluronidase treatment.

3.2 AFM 摩擦試験

Figure 3 に AFM コンタクトモードで取得した摺動 1 回目ならびに 20 回目の形状像ならびに摩擦像を示す. Figure 3 より摺動 1 回目において摩擦力は 13.4 nN だったのに対して, 摺動 20 回後では, 摩擦力が 25.1 nN と増加することが確認された.

4. 考察

摩擦刺激によって細胞表面の斥力領域が減少することを確認された. 今回の FM-AFM 観察でも同様に斥力領域が減少することが確認された. このことから, 摩擦刺激によって EGL が減少することが推察される.

また, 摩擦試験においては摺動を重ねることで摩擦力が増加する様子が確認された. これは EGL がなくなることによって発生したと考えられ, 細胞表面の摩擦力増加が血液中分子との直接接触による抵抗を増加させると推察される.

5. 結言

摩擦刺激による血管内皮細胞表面影響を調査するため, FM-AFM を用いた界面構造観察ならびに AFM コンタクトモードによる摩擦試験により, 以下の知見を得た.

- (1) FM-AFM 測定により, ヒアルロニダーゼ処理前後において弱い界面構造が失われる様子が確認され, この界面構造は EGL であると考えられる.
- (2) AFM コンタクトモードによる摩擦試験の結果, 摺動を重ねることによって摩擦力が増加する様子が確認された.

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ロジーの小暮亮雅氏に謝意を表します.

文献

- 1) J Carey et al, Design of braided composite cardiovascular catheters based on required axial, flexural, and torsional rigidities, Journal of Biomedical Materials Research, 70B, 1, (2004), p73-81
- 2) J Merrer et al, Complications of femoral and subclavian venous catheterization in critically ill patients: a randomized controlled trial, JAMA. 286, 6, (2001) 513.
- 3) P. T. Murphy et al, Non-fatal massive right atrial thrombus associated with Hickman catheter in an adult receiving chemotherapy for acute leukaemia, Postgrad Med J, 70, 825, (1994), p 520-521
- 4) 松村 剛 ピアルロン酸及びピアルロニダーゼの生化学的研究 東京女医大誌, 29, 3, (1959), p215-221.

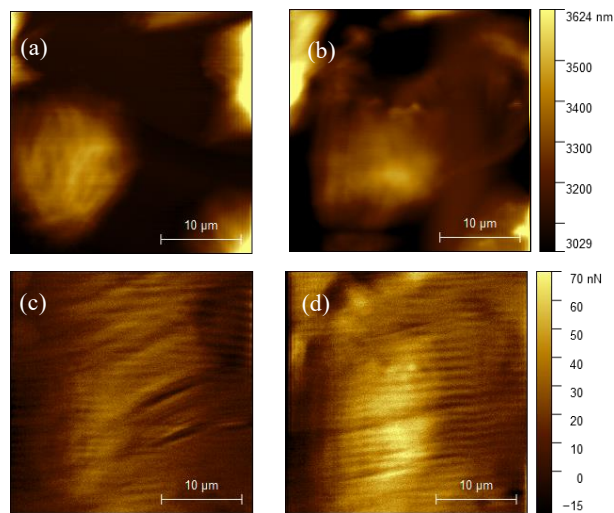


Fig. 3 Shape image of the cell at (a) 1 cycles and (b) 20 cycles, and LFM corresponding to the shape image at (c) 1 cycle and (d) 20 cycles,