

## 培養腹膜中皮細胞の傷害修復過程の画像解析

### Image analysis of remesothelialization following chemical wounding of the cultured human peritoneal mesothelial cell

ライフサイエンス専攻 人間工学研究室 0140410 大塚知恵 Chie OHTSUKA

#### 1. 背景と目的

連続携帯式腹膜透析 Continuous Ambulatory Peritoneal Dialysis (CAPD) は腹腔内に透析液を貯留させ、腹膜を透析膜として体内老廃物や水分を除去する腎不全の治療法の一つである。本療法は家庭や職場でも施行可能、安価、体液の恒常性を保てる等、数多くのメリットがあるため、患者のQOL (Quality of Life) 向上に有効である。今後保険制度や医療費問題等により、高価な血液透析より安価な腹膜透析が普及する事が望ましいと考えられる。

その一方で、CAPDのデメリットには、腹膜炎・硬化性被脳性腹膜炎の発症可能性、長期施行に伴う腹膜中皮細胞の障害(剥離、肥厚、繊維化等)による腹膜機能低下がある。後者の場合、CAPDの施行を一旦中断し腹膜機能を回復させたうえで再開する。そのため、傷害を短時間で修復させなければならない。本研究では、この障害修復メカニズムの解明を目的とし画像解析システムの構築を行うとともに、*in vitro*系における修復過程の定量解析を行った。

#### 2. 実験方法

まず細胞培養と傷害モデルについて述べる。大網より採取したヒト腹膜中皮細胞を2~3代継代し傷害実験に用いた。φ35mmの培養プラスチックシャーレ(住友ベークライト株式会社製)上でsub confluent (90%程度)になるまで培養後、1N NaOHを1μl滴下することにより細胞を壊死、剥離させて傷害モデルを作成した。傷害作成後、リン酸緩衝液にて2回洗浄し、透析液あるいは培養液に30分曝露した後に、リン酸緩衝液にて2回洗浄し0.3%FCS/M199培地を加えた。NaOHによる傷害部位の直径は約1mmであり、傷害後の培養によりほぼ円形を保ちながら修復が進む。

修復過程を倒立位相差顕微鏡(IX70,オリンパス社製)にて連続観察した。全ての機器を炭酸ガス培養装置(IX-IBC,オリンパス社製:37°C,5%CO<sub>2</sub>)下に置き、画像データはCCDカメラ(HC-300 Z/OL,オリンパス社製)により30分おきに取得した。撮影範囲は約2.3mm×3mmである。このように撮影した約4日間、200枚の画像を画像解析に使用した。

撮影画像は前処理として画像処理ソフトOPTIMAS6.0を用い解析画像を8bitグレースケール(256階調)に変換するとともに画像濃度の傾斜補正を行った。

#### 2-1 傷害面積、細胞数、細胞形態データの画像計測

傷害部位面積は修復と共に縮小し、この面積をOPTIMAS6.0の形態計測ツールで測定した。また、Threshold法を用いることで全細胞数、個々の細胞の形態の解析を行った。Threshold法とは画像濃度にある閾値を設定し、その閾値以下を単純に黒、閾値以上を白に2値化する方法である。Fig.1左に処理前の画像を、右にThresholdを施した画像を示した。図のように、良好に細胞が抽出できていることが分かる。この画像に対して個々の細胞を認識させ、細胞数と形態データを計測した。

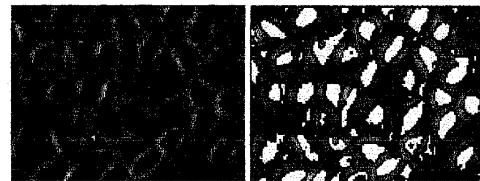


Fig.1 raw image of the mesothelial cell and the thresholding

#### 2-2 培養細胞のTracking

4日間にわたる個々の細胞のTrackingアルゴリズムをOptimas6.0のマクロ言語を用い作成した。まずTrackingを行いたい細胞面積、重心位置データを計測し、それらのデータに基づいて以降の時系列画像では細胞検出範囲(Region of Interest, ROI)を自動設定し、その範囲から細胞エリアの自動検出、形態データ計測を行う。

#### 3. 結果及び考察

##### 3-1 傷害面積等の経時変化

Fig.2に12時間おきに計測した傷害面積の変化を示す。グラフより傷害面積はほぼ線形に減少する事が分かった。また、Fig.3に細胞数変化を示す。細胞数は24時間後から増加し始め72時間後までに約30%増加した。それ以降はほぼ一定であった。Fig.2とFig.3より傷害修復はまず、細胞遊走、次いで細胞増殖により進むと考えられた。

Fig.4には個々の細胞面積(約2000個)結果の経時変化を示す。細胞面積平均値は傷害後60時間後までほぼ線形に増加した。その後は若干減少し、傷害直後よりも約30%増加した値に収束した。

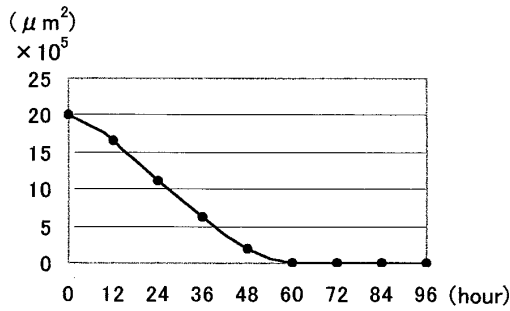


Fig.2 Change in the wounded area

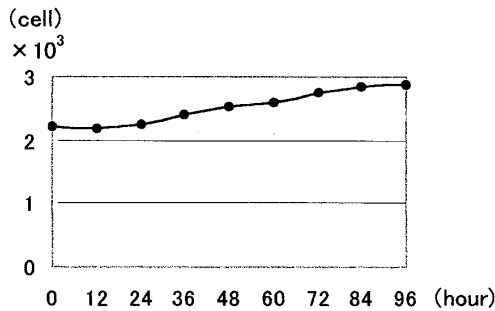


Fig.3 Change in the cell number

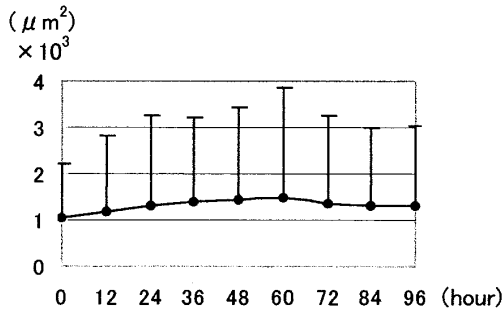


Fig.4 Change in the mean cell area

3-2 Tracking 結果

Tracking アルゴリズムによりいくつか特徴の異なる中皮細胞があることが分かった。以下その例を示す。

Fig.5(a)に傷害部位辺縁における細胞の移動速度例を示す。このように、傷害辺縁の細胞は傷害 12 時間後から 48 時間後まで高速で遊走した事が分かる。この期間は、Fig.2 の傷害面積修復期間とほぼ等しい。

一方 Fig.5(b)には傷害部位から遠く離れた細胞の移動速度例を示す。グラフに示すようにこの細胞修復とは無関係にほぼ一定に低速度で動いた。このように傷害部位に対する細胞位置により傷害修復メカニズムが大きく異なる事が示唆された。同様に、細胞サイズ等によっても細胞遊走速度、真円度等に異なった特徴が見られた。今後は、全細胞についてこれらのデータを取得する事により、中皮細胞の種類分け、役割の解明に役立つと考えられる。また本アルゴリズムは傷害修復だけでなく、生体適合性の調査、薬剤の評価等における細胞応答の解析においても応用可能であると考えられる。

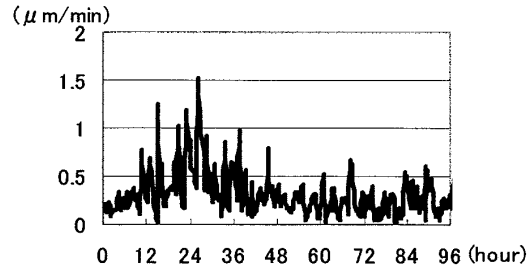


Fig.5(a) Change in cell mobility (adjacent to the wound edge)

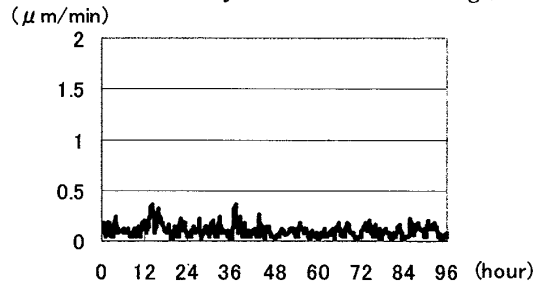


Fig.5(b) Change in cell mobility (apart from the wound edge)

4. まとめ

in vitro 実験系において CAPD 施行下における腹膜中皮細胞の傷害修復モデルを作成し、連続画像取り込み、画像解析法を確立した。その結果 (1) 腹膜中皮細胞の傷害は経時的にほぼ線形に修復する事、(2) 傷害修復はまず細胞遊走、次いで細胞増殖による、(3) 中皮細胞には移動速度、形態にいくつかの特徴の異なる細胞がある事が分かった。

【謝辞】

本研究を御指導頂きました東亜大学生命科学工学科堀内孝教授、実験のご協力を頂きました同堀内研究室宮本直氏、佐野奈美氏、藤村雄一郎氏をはじめとする皆様に感謝致します。

【参考文献】

- 堀内ら, 培養細胞の傷害修復過程の画像解析システムの開発 (腹膜中皮細胞), 腎と透析 2002, p295-299.

【発表状況】

- 腹膜透析 (CAPD) の現状と問題点, 生活工学研究, vol.3, no.2, p214-217, 2001.
- 腹膜中皮細胞の修復メカニズムに関する基礎的研究, 第 17 回ライフサポート学会大会予稿集, p61,2001.
- 腹膜中皮細胞の修復メカニズム: 修復過程における細胞のトラッキング解析, 第 10 回日本バイオイメージング学会学術集会要旨集, p160-161, 2001.
- 腹膜透析が腹膜に及ぼす影響, 生活工学研究, vol.4, no.1, p122-125, 2002.
- 成長因子が腹膜中皮細胞傷害修復に及ぼす影響, 生活工学研究, vol.4, no.2, p258-261, 2002.

(指導教官 太田裕治)