B107 流体の力学的作用による血管損傷の定量的検討

～*in vitro* 血管損傷評価システムの開発～Quantitative Investigation of Depredation by Blood Flow Induced Mechanical Stresses
～ Development of *in vitro* Evaluation System of Blood Vessel Depredation ～

○ 飯田隆一（東大院工），正 山本創太（名大），小島伸彦（東大生研），
山本貴富喜（東大生研），酒井康行（東大院医・生研），正 大島まり（東大情報学環）

Ryuichi IIDA, Department of Engineering Synthesis, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba Meguro-ku Tokyo
Sota YAMAMOTO, Department of Mechanical Science & Engineering, Nagoya University, Furo-cho Chikusa-ku Nagoya
Nobuhiko KOJIMA, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba Meguro-ku Tokyo
Takatoki YAMAMOTO, Institute of Industrial Science, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba Meguro-ku Tokyo
Yasuyuki SAKAI, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba Meguro-ku Tokyo
Marie OSHIMA, Interfaculty Initiative in Information Studies, The University of Tokyo, 4-6-1 Komaba Meguro-ku Tokyo

Key Words: Hemodynamics, Wall Shear Stress, Endothelial Cell, Internal Elastic Lamina, Blood Vessel Depredation, Blood Vessel Feeding Device, Perfusion Cultivation, and Tissue Observation

1. はじめに

動脈内の血流による力学的作用とは、壁面せん断応力によるずり刺激、血圧による伸展刺激や圧刺激などが挙げられる。これらの力学的作用は血管内皮に影響を与え、ひいては、動脈瘤や動脈硬化といった血管疾患を引き起こすことが知られている⁽¹⁾。また、これまでの病理学的研究によると、動脈硬化は壁面せん断応力の低い箇所に発症する傾向があるのに対して、動脈瘤は壁面せん断応力の高い箇所にできやすく、内皮細胞の剥離、中膜組織の菲薄化に伴って生じることが明らかとなっている⁽²⁾。加えて、内頸動脈内の血流を数値シミュレーションによって解析した結果から、脳動脈瘤の好発部位と高壁面せん断応力との相関が示されている⁽³⁾。しかしながら、生体内においては血流の子細な実験的観察は困難であり、なおかつ、生理学的要因の排除も難しいことから、壁面せん断応力が血管壁損傷に及ぼす影響については詳細が明らかにされていない。

そこで本研究では、動物から摘出した血管組織を用い、生体内を模擬した培養環境下において、力学的作用による血管内壁の損傷の定量的評価を目的として、血管損傷評価システムを開発した。本システムの特長は、流れ場を精度よく制御することにより血流の壁面せん断応力が血管内壁面に与える経時的な影響を測定できる点である。本報では、システムの仕様、性能について述べる。

2. *in vitro* 血管損傷評価システム

2.1 概要

システムの概要を図1に示す。本システムは、細胞活性、血流、血圧、体温などの観点から生体内を模擬しており、動物から摘出した血管組織を実験対象として扱える。更に、生体内よりも流れ場を精度良く制御することが可能であり、血管内面の状態を観察することによって、血流による力学的作用が血管内壁に与える損傷を定量的に検討可能である。

同図中では、ポンプによって流れを駆動し、血管流路デバイス上に固定された血管組織に流れを負荷する。同時に顕微鏡によって血管内面を観察し、また、流量計や圧力計によって流れの状態も計測する。

Fig. 1 *in vitro* Evaluation System of Blood Vessel Depredation

2.2 灌流培養

灌流培養とは、装置上に固定した血管内面に流れを加えながら培養する方法である⁽⁴⁾。すなわち、流れによって負荷を与える作動流体に培養液を用いることで、血管組織を構成している内皮細胞や平滑筋細胞を活性させる。

作動流体には、哺乳類細胞培養用基本培地（D-MEM）にウシ胎児血清（FBS）を20%混合し、更に、血液を模擬した粘度（4cP⁽⁵⁾）を実現する為にメチルセルロースを溶解した。

2.3 流れの駆動

流れの駆動には、ローラー駆動型デジタル定量ポンプ（ヤマト科学 Masterflex）を用いている。本装置では、ポンプヘッドに挟み込まれた専用のチューブを、ローラーによって潰しながら回転させることで流れを駆動する。本装置の利点としては、(1)チューブの仕様（内径）とヘッドの回転数の双方によって流量を設定できる、(2)接液部はチューブのみであり、液体の汚染の心配が無い、(3)チューブを交換できる為メンテナンスが容易で実験の度に新しいチューブを用いることが可能、などが挙げられる。特に、生体組織を扱う本研究においては、(2)(3)の点から鑑みて、無菌状態を保つ上でも適して

いる。一方、問題点としては、ローラー駆動の構造上、流れに脈動が発生する。これを除去する為に、パルスダンパをポンプ下流に設置した。

2.4 圧力負荷

通常、人間の血圧は 100mmHg 前後であることが知られている。実験においても血圧を模擬する為に、ニードルバルブを設けた。バルブの開閉によって血圧程度の圧力負荷を調節することが可能である。

圧力の計測には、標準圧力トランスデューサ（共和電業 PGM-G）を設置し、PC に接続して計測する。これらの装置は、流れを安定させる為の助走区間の外側に設置した。

2.5 温度管理

細胞や組織などの培養環境は、人間の体温である 37℃程度に保たれていることが望ましい。そこで、ガラス製の四口フラスコを作動流体となる培養液の貯蔵槽とし、恒温槽（ヤマト科学 BK-53）で湯煎して外部非接触のまま保温することとした。

なお、予備実験の結果、流路系を循環中の温度低下を考慮し、恒温槽の設定温度は 40.0℃とすることが適当であった。

2.6 血管流路デバイス

本研究で新たに開発された血管流路デバイスの概略を図 2 に示す。これは、動物から摘出した血管組織を固定する樹脂製の流路デバイスで、灌流培養および流れの負荷を行いながら血管内面の観察を可能にしたものである。

血管流路デバイスは、上下に分割された部品の接合部に、軸方向に切開した血管試料を取り付けて流路を形成し、血管内面に流れによる負荷を与える構造とした。血管組織は外面を拘束されていないため、作動流体による内圧によって半円筒形となり、円周方向に伸展可能である。さらに、血管外面も培養液に浸されているので、細胞活性も体内に近い状態を保持できる。

試料の取り付けにおいては、デバイス部品の加工面によって挟み込むと同時に、虫ピンによる点固定を施す。接着剤などを用いないため、試料への化学的な侵襲は極めて少ない。内面の観察に際しては、専用の観察窓を設けたことで、任意の時点における顕微鏡を用いた観察が可能となっている。

Fig. 2 Blood Vessel Feeding Device
(R: PV & L: SV)

2.7 観察装置

血管内面の観察に際しては、血管流路デバイスに固定したまま観察する為、作動距離が長く、また、約 10μm 程度の細胞が確認できるほどの倍率と開口数を有した対物レンズが必要である。ハードウェア構成としては、実体型蛍光顕微鏡（Leica MZ 16F Fluo Combi III）に CCD カメラ（オリンパス DP-70）を取り付けた。

3. 損傷程度の評価手法

3.1 予想される損傷

力学的作用を負荷した際に予想される血管内面の損傷には、内皮細胞の剥離、内弾性板の拡張、平滑筋組織の欠損が挙げられる。内皮細胞と平滑筋細胞に関しては、観察領域の単位面積あたりの個数（細胞個数密度⁽⁶⁾）と、細胞の配向や形状を計測し、各領域における平均値と標準誤差を用いて評価する。内弾性板に関してはその凹凸やくぼみに着目し、大きさや形状の変化を計測する。

3.2 組織染色

血管内面の観察方法について検討したところ、円筒状のまま内面を観察することは血管組織の不透明さから光学的に不可能であったため、切開することとした。切開した血管内面を細胞標識試薬によって染色し、これを蛍光顕微鏡によって観察・計測する。予備実験の結果、試薬は細胞の核を染色し、かつ生細胞に対する毒性が弱い SYTO や Hoechst が適当で、組織にも応用可能であることが確認された。血管流路デバイスに取り付けた血管組織の内面は図 3 のように観察され、内皮細胞、平滑筋細胞は、それぞれの配向および形状から識別可能なことも確認された。

Fig. 3 Internal Face of Artery, a: Endothelial Cells
(horizontally long), b: Smooth Muscle Cells (vertically long)

4. おわりに

本報では、血液の流れによる力学的作用を経時的に血管組織に与え、血管内面の損傷を観察・評価することを目的として血管損傷評価システムを開発した。また、システムの構成装置それぞれの機能についても、予備実験によって確認された。今後は、本システムを用いることによって、血流による力学的作用と血管内面の損傷との因果関係およびメカニズムを、具体的な実験により解明していく。

5. 参考文献

- (1) Adel M. Malek et, al., Hemodynamic Shear Stress and Its Role in Atherosclerosis, JAMA, Vol.282 (1999), pp.2035-2042
- (2) 例えば、加藤俊介ら、線維筋性異形成による上腕動脈瘤の手術例, 日本血管外科学会誌 第 12 巻 (2003), pp.103-107
- (3) R. Torii et, al., The hemodynamic study of the cerebral artery using numerical simulations based on medical imaging data, Journal of Visualization Vol.4 No.3 (2001), pp.277-284.
- (4) E. Okumura et, al., Mechanical and dimensional adaptation of rabbit carotid artery cultured in vitro, Medical & Biological Engineering & Computing vol.37 (1999), pp.252-256
- (5) 日本機械学会, 生体機械工学(1997), pp.70
- (6) 三上雅美, 拡散強調 MRI の骨転移質的診断への応用: 家兔骨腫瘍モデルを用いた基礎的検討, 日本医学放射線学会誌 第 64 巻 第 3 号(2004), pp.107-113