高壁面せん断応力下における血管内皮細胞損傷の定量的評価

Quantitative Evaluation of Endothelial Cell Damage Under High Wall Shear Stress

○学 磯村 遼太郎 (芝工大) 学 興 敬宏 (芝工大) 学 酒井 顕 (芝工大)
正 山本 創太 (芝工大) 正 大島 まり (東大環) 正 大石 正道 (東大生研)

Ryotaro ISOMURA, Shibaura Institute of Technology, Toyosu 3-7-5, Koto-ku 135-8548, Japan

Takahiro OKI, Shibaura Institute of Technology

Akira SAKAI, Shibaura Institute of Technology

Sota YAMAMOTO, Shibaura Institute of Technology, Toyosu 3-7-5, Koto-ku, Tokyo 135-8548, Japan

Marie OSHIMA, Interfaculty Initiative in Information Studies, the University of Tokyo, Komaba 4-6-1, Meguro-ku 153-8505, Japan

Masamichi OISHI, Institute of Industrial Science, the University of Tokyo, Komaba 4-6-1, Meguro-ku 153-8505, Japan

Key Words: Wall Shear Stress, Endothelial Cell, In Vitro, Experimental Evaluation, steady flow, Pulsatile flow

1. 緒言

脳血管疾患は平成 23 年度の日本における日本人死亡数の第 4 位となっている⁽¹⁾。この脳血管疾患による死亡要因の 10%であるくも膜下出血は動脈瘤の破裂が主要因である。動脈瘤や動脈硬化といった血管病変には、血流によって生じる壁面せん断応力(WSS)の血管内壁への作用が影響を与えることが指摘されている⁽²⁾。健康者の動脈における WSS 値は $10\sim70 \text{ dyn/cm}^2$ 程度といわれており⁽²⁾、動脈瘤はそれ以上の WSS により発生すると考えられる。過去の in vivo の研究においては、高 WSS の作用する箇所での血管内壁の損傷が確認されている⁽³⁾。In vitro の研究では培養細胞に対して WSS を負荷する研究が行われている⁽⁴⁾。しかし、in vivo の実験では定量的な損傷の評価は困難であり、また培養細胞に対する実験では細胞の接着状態が異なるため実際の生体内の環境とは大きく異なる。そこで本研究では過去の研究⁽⁵⁾で開発された血管損傷評価システムを用い、血管組織に対して WSS を負荷し、血流による力学的作用が血管内皮細胞に及ぼす影響について定量的な評価を行う。

2. 実験装置

2.1 血管損傷評価システム

Fig. 1 Experimental System and Observation Device

実験システムおよび観察デバイスの概要を図 1 に示す。本システムは血管組織に制御された流れ場を負荷することが

可能である。血管内壁観察用デバイス上に固定した血管組織に、ローラーポンプを用いて駆動した流れによる WSS を負荷する。血管内壁の状態は、蛍光実体顕微鏡を用いて観察する。定常流を負荷する場合は、ローラーポンプによる脈動除去のためパルスダンパを 2 つローラーポンプ下流に設置した。拍動流を負荷する場合はパルスダンパ 1 つと拍動を生成する拍動ポンプを下流側に設置した。

2.2 作動流体

作動流体は 1 回の実験あたり 2L の哺乳類細胞培養用基本培地 (D-MEM) にメチルセルロースを溶解させ、粘度約 10cP としたものを用いた。血液の粘度は約 $4\sim6\text{cP}$ であるが、層流による実験を行うためレイノルズ数を低くするため粘度を高く設定した。温度は 37°C に保温し、培養フラスコ用ベント栓により無菌状態を保ち、ガス交換を行った。

3. 実験方法

3.1 血管試料、染色

19 週齢の日本白色家兔をベントバルビタールナトリウムの過剰投与で屠殺した後、胸部大動脈を摘出した。血管は生細胞の細胞質染色が可能な CalceinAM により蛍光染色した。

3.2 作動流体の圧力・温度

ひずみゲージ式圧力計の値をモニタしながら内圧を 100mmHg に調節した(拍動時は圧力ピークを 100mmHg)。温度はフラスコ内と観察用デバイスの直後に温度計を設置し、フラスコを恒温槽で湯煎することで調節した。

3.3 流れの負荷、血管内壁の観察

作動流体の駆動は、ローラーポンプによって行った。このときコリオリ式流量計により実験中の流量を計測した。負荷条件は以下の 4 つとした。

- (1) 定常流低 WSS: 予備実験で内皮の個数密度に変化を生じなかった 300dyn/cm^2 を定常流の低 WSS 条件とした。
- (2) 定常流高 WSS: 予備実験結果に基づき、 950 dyn/cm^2 を定常流の高 WSS 条件とした。
- (3) 拍動流低 WSS: 平均 WSS が定常流低 WSS と同等の拍動流の負荷を行った。
- (4) 拍動流高 WSS: 平均 WSS が約 800dyn/cm^2 拍動流の負荷を行った。

各条件とも 5 サンプルずつ実験を行った。流れ負荷 15 分作用させる毎に負荷を停止し、血管内壁の状態を蛍光実体顕微鏡に装着した CCD デジタルカメラによって 4 カ所撮影した。撮影箇所は WSS が安定している流路中心から幅方向 $\pm 1\text{mm}$ 内の箇所で行った。観察箇所は X-Y ステージを用いて制御した。各試料とも流れ負荷を 4 回ずつ行った。すなわち、

累積の流れ負荷時間は 60 分であった。

3.4 拍動流の生成

定常流に対し、拍動ポンプにより流速を変動させることで拍動流を生成した。拍動ポンプは、ラックピニオンシステムを用いてダイヤフラムを往復運動させる形式である。拍動システムの外観、およびそれにより生成する拍動波形を図 2 に示す。主要動脈のウォーマスリ数 α は 1~4 である。本システムの条件で $\alpha=3$ のとき周期 T は 1.12 秒となることから拍動流の周期は 1Hz とした。また振幅は WSS の速度勾配を一定とするために低 WSS、高 WSS とともに等しくし、低 WSS での WSS 最大値と最小値が 2:1 となるように設定した。

Fig. 2 Pulsatile flow and pulsating pump

3.5 壁面せん断応力の見積もり

実験中に血管内壁に作用した WSS を見積もるため、CFD 解析を行った。矩形管モデルに、実験時に計測した流量、粘度を与えた流体を流し WSS を算出した。モデル作成には、Autodesk 社(米)AutoCAD、計算格子作成は、ANSYS 社(米)ICEM CFD 解析には、文部科学省次世代 IT 基盤構築のための研究開発“革命的シミュレーションソフトウェアの研究開発”⁽⁶⁾で開発された MC-BFlow を使用した。

3.6 損傷の評価方法

撮影された 4 枚の観察画像 (1034×1372 μm) から観察に適した様に血管内皮細胞が存在する領域 (331×439 μm) を一枚抽出する。その画像内の血管内皮細胞の個数をカウントし、初期状態を 100% として個数密度の変化を評価した。画像は必ず初期状態と同じ位置を抽出する。これにより細胞の経時的変化を見ることが可能となり、定量的に損傷を評価できる。

4. 結果・考察

図 3 に定常流負荷時の血管内皮細胞個数密度を示す。定常流低 WSS 負荷では血管内皮細胞の損傷は見られなかった。一方、高 WSS 負荷では 2 サンプルで血管内皮細胞の剥離が観察され、大きく個数密度が減少した。

(a) Low WSS (300dyn/cm²) (b) High WSS(950dyn/cm²)

Fig. 3 Endothelial Cell Density in Steady Flow

図 4 に拍動流負荷時の血管内皮細胞の個数密度を示す。拍動流低 WSS 負荷では、定常流と同様血管内皮細胞の損傷は見られなかった。拍動流の高 WSS 負荷では 2 サンプルで血管内皮細胞の剥離が観察されたが、剥離した面積が小さかったため、個数密度に大きな影響は与えなかった。

定常流及び拍動流で観察された血管内皮細胞の剥離を図 5 に示す。細胞の剥離は局所的に起きており、細胞が複数同時に剥離、または基底膜ごと剥離していると考えられる。

また、定常と拍動に共通し、低 WSS では血管内皮細胞の

形態変化が観察され、高 WSS ではアポトーシスが観察された(図 6)。形態変化した細胞は穴があいているように見えるが、これは染色されない細胞核であると考えられる。この形態変化は WSS の負荷に対し、細胞が扁平化することで基底への接着を強固にしているものと考えられる。一方アポトーシスは、このような形態変化をすることなく突然アポトーシスが起きる。このことから血管内皮細胞が WSS に耐えられない場合アポトーシスに至ると考えられる。定常流の高 WSS において大きく個数密度が減少した 2 サンプルでは、このアポトーシスの量が顕著に多かった。このことからアポトーシスの量が多いと血管内皮細胞は剥離しやすくなることが考えられる。なお、アポトーシスは核染色試薬 SYTO11 および死細胞核染色試薬 PI により染色により確認した。

(a) Low WSS (Ave 300dyn/cm²) (b) High WSS (Ave 800dyn/cm²)

Fig. 4 Endothelial Cell Density in Pulsatile Flow

Fig. 5 Endothelial Damage in High WSS(a: High WSS steady flow sample3, b: High WSS pulsatile flow sample5)

Fig. 6 Shape of the Cells (a: High WSS steady flow sample4 initial state, b: Low WSS steady flow sample4 after 15min, c: High WSS steady flow sample1 after 15min)

5. 結言

本研究では、血管損傷評価システムを用い、壁面せん断応力が血管内皮細胞におよぼす影響の定量的評価を行った。その結果、定常流、拍動流共通し高 WSS の負荷では血管内皮細胞の剥離およびアポトーシスを確認し、低 WSS の負荷では血管内皮細胞の形態変化を確認した。本研究では拍動流と定常流の明確な違いは観察されなかった。今後は負荷時間の影響や拍動の周期、振幅の違いを考慮して行く必要がある。また、形態変化やアポトーシスの剥離に及ぼす影響も調査する必要がある。

参考文献

- (1) 厚生労働省、人口動態統計 <http://www.mhlw.go.jp/>
- (2) 林鉦三郎、バイオメカニクス、コロナ社、2000。
- (3) H. Meng, *Stroke*, 38:1924-1931, 2007.
- (4) N. Sakamoto et al./ *Biochemical and Biophysical Research Communications* 395 (2010) 264-269
- (5) 飯田隆一、東京大学修士論文、2007。
- (6) 文部科学省次世代 IT 基盤構築のための研究開発“革命的シミュレーションソフトウェアの研究開発”