せん断応力負荷下で内皮細胞を培養した疑似血管マイクロデバイスの
開発と形態変化の計測*杉 井 康 彦^{*1}Development of Micro Fluidic Device Cultured Endothelial Cells
with Fluid Shear Stress Exposure and Measurement
of Morphological ResponseYasuhiko SUGII^{*2}^{*2} Department of Mechanical Engineering, Kogakuin University,
2665-1 Nakano, Hachioji-shi, Tokyo, 192-0015 Japan

In order to investigate vascular diseases such as cause of atherosclerosis and myocardial infarction, relationships of endothelial cells (ECs) covered with surface blood vessels and blood flow stimulation have been experimentally studied. In the study, a blood vessel model for in vitro experiment made from polydimethylsiloxane (PDMS) microchip with a straight microchannel with 400 μm width and 75 μm depth was developed. By optimizing cells cultured condition such as the liquid introduction method and the surface coating for enhancement of cell attachment on the microchannel wall, a cell culture method in the microchannel with fluid shear stress to be confluent were developed. The morphological response, such as shape index, area and orientation, of cultured ECs with shear stress 0.1 Pa was investigated. In the period of low cell density until 60 hours culture, cells were elongated and aligned with flow direction. In the period of over about 50% cell density of confluent, cells became gradually randomly distributed. The area of cell at confluent with shear stress became 1.7 times larger than that of cell without shear stress. The results indicated that interaction of surrounding cells influenced the morphological response of ECs.

Key Words: Endothelial Cell, Cell Morphology, Shear Stress, Microchannel, Bio-Fluid Mechanics

1. 緒 言

微小血管系は細動脈・毛細血管・細静脈などの微小血管網、毛細リンパ管などのリンパ系および細胞組織間で構成されており、ここを流れる血液は生体の内部環境を恒常的に維持するために不可欠な酸素や養分を組織細胞に供給している。動脈硬化、心筋梗塞、脳梗塞などに代表される循環疾患の増加に伴い、その病因の解明が重要な課題となっており、これには微小な血管内の流れ場の把握や、血管の内側を覆っている血管内皮細胞と血流による刺激との関係を調べる事が重要である⁽¹⁾⁽²⁾。ヒトの生理的条件下では、血流によって大動脈で1~2、細動脈で1~2、静脈で0.1~0.6Paのせん断応力が内皮細胞にかかっていると推定されており⁽³⁾、せん断応力による細胞の形態変化⁽⁴⁾⁽⁵⁾や細胞内カルシウムイオンやNO濃度など⁽⁶⁾⁽⁷⁾の変化が報告されている。また、せん断応力だけでなく、細胞同士の接触も形態

変化に影響を与えることが示唆されている⁽⁴⁾⁽⁵⁾。

著者らは、マイクロ加工技術を用いて作成したマイクロ流路内で血管内皮細胞を培養して疑似血管マイクロデバイスを開発し、内皮細胞への白血球の付着性について調べた⁽⁸⁾。そこでは、培養中は0.007Paと低いせん断応力を保ち、コンフルエントになった後、せん断応力を負荷した。Korinらは、マイクロ流路内で繊維芽細胞の培養を行い、0.03Pa以下のせん断応力の負荷でのみコンフルエントまで培養が可能となった⁽⁹⁾。

一方、マイクロPIV法を用いて内皮細胞近傍の速度場計測が行われており、ラットの腸間膜の細動脈の血流計測結果から、層流の理論解より求めた壁面せん断速度より、小さくなっていることが報告されている⁽¹⁰⁾⁽¹¹⁾。また、細胞を平板とした壁面せん断応力ではなく、細胞の形状を考慮した微視的なせん断応力の重要性が提案されている⁽¹²⁾。

本研究では、マイクロ流路内でせん断応力を負荷しながら培養する方法を確立し、流路壁面に内皮細胞を備えた疑似血管マイクロデバイスを開発した。開発したデバイスを用いて、せん断応力を負荷しながら培養を行い、細胞の形

* 原稿受付 2009年4月9日。

^{*1} 正員、工学院大学総合研究所(〒192-0015 八王子市中野町2665-1)。

E-mail: sugii@cc.kogakuin.ac.jp

態変化を計測し、増殖による細胞密度の変化と細胞の伸長と配向との関係を調べた。

2. 疑似血管マイクロデバイスの開発

2・1 マイクロデバイスの作成 図1に作成した幅400 μm 、深さ75 μm 、長さ2cmの直線流路から成るPDMS(polydimethylsiloxane)製マイクロデバイスを示す。スピノータを用いてガラス基板にフォトリソ剤(SU-8)を塗布し、ホットプレートで焼き固め、マスクアライナを用いてフォトマスクに描画したマイクロ流路の図面をレジスト剤に露光した。露光した後、再びホットプレートで焼き、現像液で現像して型を作成し、その上にPDMSを流し込みオーブンで焼き固めた後、引き剥がした。酸素プラズマをチップ表面に照射して表面処理を行って流路を親水性にした後、厚さ0.17mmのガラスに貼り付けて溶液導入用の内径0.3mmのチューブを取り付けた。なお、PDMSは酸素透過性で、無色透明である。

Fig. 1 PDMS microchannel

2・2 血管内皮細胞の培養方法 これまでに確立された培養ディッシュなどにおける細胞培養技術では、培養ディッシュなどに細胞と栄養である培養液を入れ、インキュベータ内で静置することによって細胞の培養が可能であった。一方、マイクロ流路内での培養は、微小空間であるために培養液を充填しただけでは、細胞に対して培養液の量が少なく栄養や酸素が不足し、さらに老廃物が滞留するために、細胞を育てることが出来ない。しかし、新鮮な培養液を細胞に連続的に供給する必要があるが、還流の際の気泡の混入や汚染、還流による細胞の剥がれなどの問題などがあり、非常に困難であった。そのため、必要最小限の流量で培養液を還流させて培養が行われている⁽¹⁷⁾。その際の細胞に負荷されるせん断応力は、0.007Paであった。なお、レイノズル数が1以下と十分に小さく流れは層流であり、矩形流路底面の壁面せん断応力 τ は、理論的に

$$\tau = \frac{6\mu Q}{a^2 b} \quad (1)$$

となる⁽²⁰⁾。ここで、 μ は粘度、 Q は流量、 a, b はそれぞれ流路の深さと幅である。

本研究では、大きなせん断応力を負荷しながら細胞を培養する方法を検討した。正常ヒト臍帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs)を用い、直径35mmの細胞培養ディッシュに播種し継代した4代目の細胞を用いた。培地として内皮細胞培地キット(EGM-2, Cambrex)を用いた。シリンジポンプを用いて吸引する方法によって溶液をマイクロ流路内に導入し、細胞懸濁液などの種々の溶液の交換の際の気泡の混入や汚染を避けた。70%エタノールおよび紫外線で滅菌したマイクロ流路の壁面を、細胞外マトリックスの一つであるマトリゲルを用いてコーティングした。マトリゲルの濃度は、0.1mg/mlであり、コーティング溶液を5.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ の流量で吸引し、5%の CO_2 インキュベータ内で1時間静置させた。静地後、無血清のD-MEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco)溶液を流して洗浄した。細胞濃度が 10^6 cells/mlのHUVECsの懸濁液を流量5.0 $\mu\text{l}/\text{min}$ でシリンジポンプを用いた吸引により、作成したマイクロ流路内に導入した。マイクロチューブの両端をクリップで挟んで流れを止め、細胞の接着のため3時間、37.0 $^{\circ}\text{C}$ 、5.0%の CO_2 インキュベータ内に静置した。細胞のチャンネル壁面への接着を確認した後、37.0 $^{\circ}\text{C}$ 、5.0%の CO_2 インキュベータ内で、落差法を用いて培養液を還流させ、培養中連続してせん断応力を細胞に負荷した。なお、流入口と流出口の水位差を与えてマイクロ流路内に純水を流し、電子天秤を用いて計測した質量から流量を求めることにより、検定を行った。

20倍(N.A.=0.40)の位相差対物レンズと1004 $\times$ 1002画素、14bitの高感度カメラ(iXon 885, Andor)を取り付けた倒立型位相差顕微鏡(IX71, Olympus)を用いて、マイクロ流路内の内皮細胞を撮影した。撮影領域は、402 $\mu\text{m} \times 401\mu\text{m}$ であり、流路下部のガラス面に焦点を合わせて、細胞画像をコンピュータに取り込み、画像解析ソフトImage Jを用いて、Shape Index⁽²⁰⁾および配向角を求めた。Shape Index(SI)は、

$$\text{Shape Index} = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (2)$$

で定義される。ここで、 A は細胞の面積、 P は細胞の周囲長である。配向角は、最適楕円の長軸と流れ方向のなす角とし、時計回りを正とした。

本研究では、細胞にフィッティングした最適楕円の面積および周囲長からSIを求めた。マイクロ流路内の各培養時間および静置培養の細胞画像から、流路壁面近傍の細胞と分裂中の細胞を除いた86から121個の細胞を抽出し解析を

行った。得られたSIについて、スチューデントt検定を行った。

3. 実験結果

図2(a)に細胞を導入後3時間の流路内の様子を示す。 $y = 0$ と $400\text{ }\mu\text{m}$ が流路壁面であり、培地は落差法を用いて、細胞に 0.1Pa のせん断応力が負荷されるように、右から左へ流した。細胞が底面に接着しており、丸みを帯びて広がっている。大きさは $40\text{ }\mu\text{m}$ 程度であり、導入直後と比較して2.5倍程度の大きさになっている。細胞密度は、 $0.46 \times 10^2\text{ cells/mm}^2$ であった。細胞の接着率が低い原因として、流れにより細胞が剥がれたためと考えられる。図2(b)に培養開始から154時間後の細胞画像を示す。細胞の大きさは、 $100\text{--}150\text{ }\mu\text{m}$ 程度の細長い形状や丸みを帯びた形状である。細胞が底面に隙間なく広がっており、130時間後の細胞密度とほとんど変化が見られず、増殖が停止したコンフルエントとなった。

図3にマイクロ流路内でせん断応力を負荷しながら培養した内皮細胞の増殖曲線を示す。コントロールとして同様にマトリゲルでコーティングした直径 35 mm のディッシュにより静置培養した結果を用いた。0時間の値は、細胞を撚いた密度であり、3時間後から接着し増殖した細胞の密度である。 0.1 、 1.0Pa のせん断応力の負荷をかけながらマイクロ流路内で培養した場合には、細胞の接着率はそれぞれ 46.8 、 91.6% となった。 0.1Pa のせん断応力を負荷しながら培養した細胞では、154時間後に $2.07 \times 10^2\text{ cells/mm}^2$ と、コンフルエントになった。 1.0Pa のせん断応力を負荷しながら培養した細胞では、64時間後に気泡の混入により細胞が死滅した。 CO_2 インキュベータと顕微鏡とのデバイスの移動の際の人為的ミスが原因により気泡が混入したと考えられる。操作手順の改良などにより、気泡の混入を避けることができ、コンフルエントまで培養可能と思われる。一方、静置培養した内皮細胞は、播種後116時間後にコンフルエントになり、細胞密度は $2.49 \times 10^2\text{ cells/mm}^2$ と 0.1Pa のせん断応力を負荷したものより大きな細胞密度となった。

図4に、細胞のSIと面積を示す。細胞の接着直後は、せん断応力を負荷しておらず、SIは 0.98 ± 0.02 と円形に近い事を示し、面積も $0.84 \pm 0.45 \times 10^3\text{ }\mu\text{m}^2$ と最小値を示した。60時間付近でSIが最小で面積が最大となり、コンフルエント時では、

Fig. 2 Endothelial cells cultured in microchannel

Fig. 3 Growth curves of ECs cultured in microchannel

SI が 0.81 ± 0.15 、面積が $2.37 \pm 1.37 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ となった。

図 5(a)に細胞の配向角を示す。配向角の平均値は、ほぼ 0 度付近になっており、流れ方向に対して対象に分布している。一方、配向角の標準偏差は、接着直後に 50.3 度と最大であり、図 4 と同様に 60 時間程度で 21.9 度と最小となり、再び増加してコンフルエント時に 43.7 度となった。図 5 (b)-(e)に配向角のヒストグラムを示す。接着直後は、各角度の頻度が一樣でありランダムに配向しているが、せん断応力の負荷とともに配向角 ± 20 度の頻度が増加し、再び頻度が一樣になっている。このことから、60 時間付近で細胞が流れ方向に最も配向し、細胞密度が増加するにつれて、配向が解消されていることがわかった。

図 6 に 0.1 Pa のせん断応力を負荷して培養したコンフルエントになった場合と静置培養した場合との比較を示す。静置培養およびせん断応力を負荷して培養した細胞の SI は、それぞれ 0.85 ± 0.11 、 0.81 ± 0.15 であり、せん断応力を負荷して培養した細胞が有意に(有意水準 $p < 0.05$)伸長している。また、静置培養およびせん断応力を負荷して培養した細胞の面積は、それぞれ $1.43 \pm 0.53 \times 10^3$ 、 $2.36 \pm 1.37 \times 10^3 \mu\text{m}^2$ と、せん断応力を負荷して培養した細胞が有意に(有意水準 $p < 0.05$)広がっている。

Fig. 4 Shape index and area of ECs cultured in microchannel with shear stress 0.1 Pa

(a) Angle of ECs orientation

(b) 3 hours with shear stress 0.1 Pa

(c) 55 hours with shear stress 0.1 Pa

(d) 154 hours with shear stress 0.1 Pa

Fig. 5 Histograms of Angle of ECs orientation cultured with shear stress 0.1 Pa and without shear stress

Fig. 6 Shape index and area of ECs cultured with shear stress 0.1 Pa and without shear stress

4. 考 察

本研究では、マイクロ流路内でせん断応力を負荷しながら培養する方法を確立し、0.1Paのせん断応力を負荷しながら培養した細胞の形態変化を観

察した。増殖初期の培養開始後 60 時間程度までは、SI の減少と細胞面積の増加、および細胞の流れ方向への配向が観察された。60 時間以降の細胞密度の増加と共に、SI の増加と細胞面積の減少、および配向の解消が観察された。

増殖初期とコンフルエントの約 50% 程度の細胞密度における細胞の伸長と配向の違いの原因は、細胞間の接触の程度の違いによることが考えられる。細胞間の接着によって、接着たんばくの産生量や細胞増殖に影響があることが報告されており、細胞密度が小さい時は、細胞間の接着が少なく流れによるせん断応力の影響が大きくなり、細胞密度が増加するにつれて細胞間の接着の影響が強くなると考えられる。このことから、細胞間の接着が、細胞の形態変化に重要な役割を果たしていると考えられる。また、0.1Pa のせん断応力を負荷しながら培養しコンフルエントになった細胞は、静置培養に比べ、有意に伸長して面積が 1.7 倍程度に広がり、0.1Pa と比較的小さなせん断応力でも形態変化が生じた。

コンフルエントになったウシ大動脈内皮細胞 (BAEC) に 0.1~0.5Pa のせん断応力を負荷した場合、8 日間形態変化が起らず、0.8Pa のせん断応力の場合に 2 日目で形態変化が観察されており⁽⁶⁾、本研究での 0.1Pa のせん断応力による伸長と相違が見られる。一方、内皮細胞が増殖するスペースがある場合には、せん断応力が増殖を刺激し、細胞同士が密に密着している場合にはせん断応力は増殖に影響しないか抑制すると考えられており⁽²⁴⁾、本研究の増殖時の伸長・配向の変化との関連が考えられる。

また、せん断応力により細胞の高さが小さくなり、せん断応力の勾配が小さくなるように変形していると考えられており⁽⁷⁾、隣接する細胞の形状が細胞近傍の微視的な流れに大きく影響することが報告されており⁽²²⁾、隣接する細胞の形状が細胞の形態変化に影響することが考えられる。

今後、細胞近傍の微視的な流れを直接可視化・計測し、細胞にかかるせん断応力の勾配と形態変化の関係や周囲の細胞との相互作用を調べる必要がある。

5. 結 言

PDMS 製マイクロ流路内で血管内皮細胞の培養方法を検討し、流れによるせん断応力を負荷しながらコンフルエントにまで培養が可能となった。細胞密度が小さい増殖初期

では、細胞の伸長と配向が見られた。細胞密度が増加するにつれて、伸長が減少し配向が解消された。

本研究は一部、平成19-20年度科学研究費補助金 基盤研究(B)「疑似血管デバイスを用いた内皮細胞と流れによる刺激との相互作用の解明」(課題番号 19360089)の援助を受けた。

文 献

- (1) Gouverneur, M., Berg, B. V. D., Nieuwdorp, M., Stroed, E., Vink, H., Vasculoprotective properties of the endothelial glycocalyx: effects of fluid shear stress, *J. Inter. Medicine*, Vol.259, No.4 (2006), pp.393-400.
- (2) Pries, A. R., Secomb, T. W., Microvascular blood viscosity in vivo and the endothelial surface layer, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol. 289 (2005), pp. H2657-H2664.
- (3) Kamiya, A., Bukhari, R., Togawa, T., Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function, *Bulletin of Mathematical Biology*, Vol.46, No.1 (1984), pp.127-137.
- (4) Fry, D. L., Acute vascular endothelial changes associated with increased blood velocity gradients, *Circulation Research*, Vol. 22 (1968), pp.165-197.
- (5) Levesque, M. J. and Nerem, R. M., The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress, *J. Biomech. Eng.*, Vol.107 (1985), pp.341-347.
- (6) Dewey, C. F. Jr., Bussolari, S. R., Gimbrone, M. A. Jr., Davies, P. F., The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress, *J Biomech Eng.*, Vol.103, No.3 (1981) pp.177-185.
- (7) Barbee, K. A., Davies, P. F., Lal, R., Shear stress-induced reorganization of the surface topography of living endothelial cells imaged by atomic force microscopy, *Circulation Research*, Vol.74 (1994) pp.163-171.
- (8) Ando, J., Komatsuda, T., Kamiya, A., Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, Vol.24, No. 9 (1988), pp.871-877.
- (9) Nozawa, T., Cheng, C. P., Noda, T., Little, W. C., Effect of exercise on left ventricular mechanical efficiency in conscious dogs, *Circulation*, Vol.90 (1994), pp.3047-3054.
- (10) Berger, H. J., Prasad, S. K., Davidoff, A. J., Pimental, D., Ellingsen, O., Marsh, J. D., Smith, T. W., Kelly, R. A., Continual electric field stimulation preserves contractile function of adult ventricular myocytes in primary culture, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol.266 (1994), pp.H341-H349.
- (11) Mochizuki, S., Vink, H., Hiramatsu, O., Kajita, T., Shigeto, F., Spaan, J. A. E., Kajita, F., Role of hyaluronic acid glycosaminoglycans in shear-induced endothelium-derived nitric oxide release, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, Vol.285 (2003), pp.H722-H726.
- (12) Oblak, T. D. A., Root, P., Spence, D. M., Fluorescence monitoring of ATP-stimulated, endothelium-derived nitric oxide production in channels of a poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic device, *Anal. Chem.*, Vol.78, No.9 (2006), pp.3193-3197.
- (13) Sakamoto, N., Oi, M., Ohashi, T., Sato, M., Nitric oxide production and smooth muscle cell phenotype of endothelial cell-smooth muscle cell cocultured model, *J. Biomech. Sci. Eng.*, Vol.1, No.1 (2006), pp.224-233.
- (14) Masuda, M., Fujiwara, K., Morphological responses of single endothelial cells exposed to physiological levels of fluid shear stress, *Front Med. Biol. Eng.*, Vol.5, No.2 (1993), pp.79-87.
- (15) Katakoka, N., Ujita, S., Kimura, K., Sato, M., The morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells to fluid-imposed shear stress under sparse and colony conditions, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series C*, Vol.63, No.607 (1997), pp. 838-845.
- (16) Tanaka, Y., Kikukawa, Y., Sato, K., Sugii, Y., Kitamori, T., Culture and leukocyte adhesion assay of human arterial endothelial cells in a glass microchip, *Anal. Sci.*, Vol.23, No.3 (2007), pp.261-266.
- (17) Korin, N., Bransky, A., Dinnar, U., Levenberg, S., A parametric study of human fibroblasts culture in a microchannel bioreactor, *Lab on a Chip*, Vol.7 (2007) pp.611-617.
- (18) Sugii, Y., Nakano, A., Nishio, S., Minamiyama, M., Blood flow velocity measurement in microcirculation field by means of highly accurate iterative PIV, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series B*, Vol.67, No.662 (2001), pp. 2431-2436.
- (19) Sugii, Y., Nishio, S., Okamoto, K., In vivo PIV measurement of red blood cell velocity field in microvessels considering mesentery motion, *Physiol. Meas.*, Vol.23 (2002), pp.403-416.
- (20) Smith, M. L., Long, D. S., Damiano, E. R., Ley, K., Near-wall μ -PIV reveals a hydrodynamically relevant endothelial surface layer in venules in vivo, *Biophysical J.*, Vol.85 (2003), pp.637-645.
- (21) Sugii, Y., Nishio, S., Okamoto, K., Nakano, A., Minamiyama, M., Blood flow velocity measurement in the microcirculation using highly accurate iterative PIV : 2nd report, analysis of ensemble averaged velocity in rat mesenteric arterioles, *Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers, Series B*, Vol.70, No.691 (2004), pp. 701-706.
- (22) Fukushima, S., Fujioka, H., Tanishita, K., Shear stress distribution on the surface of endothelial cells during flow-induced morphological remodeling, *JSME International Journal Series C*, Vol. 46, No.4 (2003), pp.1275-1283.
- (23) Usami, S., Chen, H.-H., Zhao, Y., Chien, S., Skalak, R., Design and construction of a linear shear stress flow chamber, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol.21, No.1 (1993), pp.77-83.
- (24) Cornhill, J. F., Levesque, M. J., Herderick, E. E., Nerem, R. M., Kilman, J. W., Vasko, J. S., Quantitative study of the rabbit aortic endothelium using vascular casts, *Atherosclerosis*, No.35, Vol.3 (1980) pp.321-337.