低密度分布およびコロニー状態での培養内皮細胞の
流れに対する形態反応*片岡 則之^{*1}, 宇治田 伸吾^{*2}
木村 圭秀^{*3}, 佐藤 正明^{*1}The Morphological Responses of Cultured Bovine Aortic Endothelial Cells to
Fluid-Imposed Shear Stress under Sparse and Colony ConditionsNoriyuki KATAOKA, Shingo UJITA,
Keishu KIMURA and Masaaki SATO

The morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells to fluid-imposed shear stress under sparse and colony conditions were studied. Applied shear stress was controlled to 2 Pa and the exposure time was set to be between 1 and 24 hours. Before and after flow exposure, the shape index and the angle of cell orientation to flow direction of each individual cell were measured. In the experiment under sparse conditions, the shape index was 0.33 ± 0.13 (mean $\pm$ SD) and cells almost randomly distributed under the no-flow condition. This randomness continued following application of shear stress for 24 hours, and a morphological difference between the cells under no-flow conditions and after exposure to shear stress was not observed. In the experiment under colony conditions, the cells in the center portion of the colony were round and were randomly oriented under no-flow conditions. After exposure to shear stress for 24 hours, the cells in the center portion were elongated and aligned with the flow direction, although the cells on the periphery were randomly oriented. From these results, we conclude that the degree of cell to cell contact may affect the morphological response of endothelial cells to fluid-imposed shear stress.

Key Words: Biological Engineering, Shear Flow, Endothelial Cell, Cell Morphology, Sparse, Colony, F-Actin Filament, Bio-Fluid Mechanics

1. はじめに

血管の内腔を一層に覆っている血管内皮細胞は常に血流にさらされ、せん断応力をうけている。生体内では血管内皮細胞は血流を反映した形態をとることが観察され⁽¹⁾⁽²⁾、培養細胞を用いた研究によっても流れによってその形態を変化させることが報告されている⁽³⁾⁽⁴⁾。血管内皮細胞は単なる血管の内張りではなく、血管径の調節や物質透過性の制御などさまざまな機能をもっていることが知られており、血管径の調節は endothelin, EDRF (endothelial derived relaxing factor) などの生理活性物質の分泌を通して行われる⁽⁵⁾。これらの内皮細胞の機能も流れによって変化することが確認されている⁽⁶⁾。血管内皮細胞の機能変化はアテローム性動脈硬化症の発生に密接な関係があると考えられ、内皮細胞の力学的刺激の感知機構には多くの研究者が関心をもっている。培養内皮細胞に流れによる

せん断応力を負荷すると、瞬時に細胞内カルシウムイオン濃度の上昇が起こり⁽⁷⁾、続いてアクチンフィラメントの変化が生じ、数時間後には流れの方向に配向し伸長するといった形態変化があらわれる⁽⁸⁾。このような細胞内カルシウムイオン濃度に対する内皮細胞の応答機構として、せん断応力などの力学的刺激を直接感知する機構と、流れによって ATP などの刺激物質の細胞近傍の濃度が変化することなどが考えられているが⁽⁹⁾、いまだに明確な解答は得られていない。また、内皮細胞がコンフルエントな状態になっていない場合、すなわち細胞同士がお互いに接触していない場合には、内皮細胞は流れに対して配向および伸長しないことが報告されている⁽¹⁰⁾。このことから細胞が力学的刺激に対して応答する際には、細胞同士の接触が重要な意味をもつと考えられる。

そこで本研究では、血管内皮細胞の力学的刺激に対する感知機構に検討を加えるため、低密度状態およびコロニーを形成した状態での培養血管内皮細胞に流れを負荷し、F-アクチンフィラメントおよび細胞の形態変化を調べた。

* 原稿受付 1996年7月15日。

*¹ 正員、東北大学工学研究科(〒980-77 仙台市青葉区荒巻字青葉)。*² 東北大学大学院(現：フォーバル)。*³ 東北大学大学院[現：日立精機(株)]。

2. 実験方法

2.1 血管内皮細胞の採取 ウシ大動脈の内皮細胞の採取と継代培養は Shasby と Shasby⁽¹¹⁾ の方法に準じて行った。屠殺直後のウシより採取した胸部から腹部に到る大動脈を長軸方向に切開し、固定台の上に内腔面を上にしてピンで固定した。大動脈の長軸方向に直角にメスをあて、軽く擦すように一方方向にのみメスを移動させ、内皮細胞を物理的にはく離した。メスに付着した細胞を培養液に懸濁し、面積 25 cm² の細胞培養フラスコ(住ベメディカル株式会社、および FALCON)にはん種した。培養液として 10% の非働化(inactivate)したウシ胎児血清(JRH Biosciences, KS, USA)および抗生物質(Penicillin-Streptomycin; GIBCO) (1 units/ml)を加えたダルベッコ改変イーグル培地(Dulbecco's modified Eagle medium; GIBCO)を用い、細胞は温度 37°C, CO₂ 5%に保たれたインキュベータ(MODEL 510; NAC SYSTEMS, および MODEL 5410; NAPCO)内で培養した。

血管内皮細胞をフラスコにはん種して 4~5 日後、細胞が十分に増殖したことを位相差顕微鏡で確認した後、PBS(-)で 2 回洗浄し、トリプシン(Trypsin-EDTA; GIBCO)を用いて細胞をはく離させ、さらにその中に培養液を加え細胞を分散させて、1:4 の面積希釈率でフラスコにはん種した。実験には、初代培養時に混入した他の細胞をほぼ完全に除くことのできる継代 4 代めから、老化による形質転換を起こさないことをあらかじめ確認済みである継代 8 代めまでのものを使用した。採取した細胞が内皮細胞であることの同定は、特徴的な数石状の形態を位相差顕微鏡下で観察するとともに、内皮細胞に特異的に取込まれるアセチル化 LDL(low density lipoprotein, acetylated, DiI complex (DiI-Ac-LDL); Molecular Probes, Inc., USA)を用いて蛍光顕微鏡で確認することにより行った。

実験には、細胞が単独に存在し他の細胞と接触していない状態(低密度分布状態)と、コロニーを形成した状態の内皮細胞を用いた。低密度分布状態では、80×80 mm のガラス板上に 5×10³ cells/cm² の濃度ではん種した細胞を、はん種後 1 日めまたは 2 日めに用いた。コロニー形成に関しては、トリプシン処理を行わず、セルスクレイパー(住ベメディカル株式会社)によって物理的に細胞をはく離した。コンフルエントの細胞を PBS(-)で 2 回洗浄したあと、セルスクレイパーでフラスコ底面全体を擦り細胞をはく離し、培養液を加え軽くピペッティングしてガラス板にはん種し、

はん種後 3~4 日めに実験に用いた。継代濃度は面積 75 cm² のフラスコ一つにつき 80×80 mm のガラス板 2 枚に継代した。

2.2 実験装置 培養内皮細胞に流れを負荷するために用いた平行平板形フローチャンバを図 1 に示す。ガラス板とアクリル流路の間に厚さ 0.5 mm のシリコンラバ・ガスケットを挟み、流路の幅は 60 mm, 高さは 0.5 mm である。図 2 に実験回路の概要を示す。この流路内には継代培養に用いたものと同じ

Fig. 1 Schematic diagrams of flow chamber

Fig. 2 Schematic diagrams of the flow circuit

培養液をローラポンプによって灌流させ、リザーバには 95% Air+5% CO₂ の混合ガスを吹送して培養液の pH を一定に保ち、また、リザーバを恒温槽に浸して培養液を 37°C に保った。

本研究では、低密度分布の細胞に 2 Pa のせん断応力を 1, 3, 6, 12, 24 時間負荷し、コロニー状態の細胞には 2 Pa のせん断応力を 24 時間負荷した。

さらに、低密度分布状態における血管内皮細胞の挙動と流れの関係を見るために、以下の実験を行った。位相差顕微鏡 (CK2; オリンパス光学工業) に取付けた CCD カメラ (KP-C550; 日立電子) を使用して、せん断応力負荷開始から 5 時間の顕微鏡像をタイムラプスビデオ (AG-6720A; 松下電器産業) に記録した。次にビデオの映像を 3 分間隔でコンピュータに取込み、それぞれ個々の細胞について後述する形態計測を行った。この実験では、細胞に 2 Pa, 1 Pa のせん断応力を負荷し、コントロール実験としては、せん断応力負荷

実験と同様に流路を組立て、せん断応力を 0.1 Pa 未満にし、灌流装置全体をフードで覆い、その中の温度をヒータで 37°C に保ちながら観察を行った。

2.3 F-アクチンフィラメントの染色, および形態計測 静置培養下, およびせん断応力負荷後の血管内皮細胞を PBS(-) で洗浄した後, 10% 中性緩衝ホルマリン液 (和光純薬工業株式会社, 大阪) に 5 分間浸し固定した。PBS(-) で洗浄後さらに, 0.1% Triton X [Polyoxyethylene(10)Octylphenyl Ether; 和光純薬工業株式会社: PBS(-) で 0.1% に希釈] に 5 分間浸して細胞膜を破壊した。PBS(-) で洗浄した後, 150 nM の rhodamine-phalloidin (Molecular Probes, Inc., USA) を加え 20 分間染色し, PBS(-) で洗浄した。次に, 細胞を PBS(-) とグリセリン (和光純薬工業株式会社) を 1:1 に混合し, 蛍光色素の退色を防止するために 3% のプロピルガレート (*n*-Propyl Galate; 和光純薬工業株式会社) を溶かした溶液中に浸

Fig. 3 Typical photomicrographs of rhodamine-phalloidin stained bovine aortic endothelial cells before and after exposure to shear stress

した。

試料は落射蛍光顕微鏡(IMT-2/IMT2-RFC, および BX60/BX-FLA; オリンパス光学工業)を用いて観察し, 高感度カメラ(C2400; 浜松フォトニクス)を通して顕微鏡像をコンピュータ(Power Macintosh 7100/80AV; Apple Computer)に取込んだ。コンピュータ上で画像解析ソフト NIH Image を用いて以下のパラメータについて計測を行った。

血管内皮細胞の形態は shape index⁽¹²⁾と配向角(angle of orientation)の二つのパラメータを用いて評価した。shape index (SI) は式(1)によって定義される。

$$\text{Shape Index} = \frac{4\pi \cdot A}{P^2}$$

ここで,

A: 細胞の面積

P: 細胞の周囲長

である。

配向角は流れの方向と細胞の長軸のなす角度とし, 時計回りを負, 反時計回りを正とした⁽¹³⁾。

得られた結果について実験群ごとに, Shape index についてはスチューデント *t* 検定を, 細胞の配向角については F 検定を用いて統計検定を行った。

3. 結 果

低密度分布状態の内皮細胞に 2 Pa のせん断応力を負荷したときの, F-actin filament の蛍光顕微鏡写真を図 3 に示す。図 3(a) は静置培養, 図 3(b) は流れ

Fig. 4 Effect of the time of exposure to shear stress on the shape index. Control: $SI=0.33 \pm 0.13 (n=3)$; After 1 h: $SI=0.38 \pm 0.13 (n=3)$; 3 h: $SI=0.33 \pm 0.14 (n=3)$; 6 h: $SI=0.33 \pm 0.10 (n=3)$; 12 h: $SI=0.36 \pm 0.16 (n=3)$; 24 h: $SI=0.34 \pm 0.15 (n=3)$. mean ± S. D.; n: number of glass plate

負荷 6 時間後, 図 3(c) は同 12 時間後, 図 3(d) は同 24 時間後の写真で, 流れは左から右である。各時間において内皮細胞は, 仮足を伸ばしたものが多く, 静置培養群と比べ, また各時間において比較しても細胞形状の時間経過による顕著な違いは観察されなかった。

計測した shape index の値を図 4 に示す。すべての時間でおおの 3 回の実験を行い, 1 回の実験で約 100 個の細胞について形態計測を行った。おおのの時間における shape index の値には有意差はなく, 低密度分布状態の内皮細胞の形状は, 流れのせん断応力の負荷時間に依存しないことがわかった。また, 配向角の分布(図 5)についても, おおのの時間における細胞はランダムな方向を向いており, 流れの方向に配向していないことがわかる。

顕微鏡観察下で内皮細胞にせん断応力を負荷し, そのようすを VTR に記録したときの細胞形状の変化の典型例を図 6 に示す。

細胞の形状は周囲長と shape index を用いて評価した。図 6(a) は静置培養下での, 図 6(b) はせん断応力 1 Pa の流れを負荷したとき, 図 6(c) はせん断応力 2 Pa の流れを負荷したときの結果である。このグラ

Fig. 5 Histograms showing the angle of orientation before and after exposure to shear stress. Control: $\theta = -2.6 \pm 52.8 (n=3)$; After 1 h: $\theta = 11.7 \pm 57.9 (n=3)$; 3 h: $\theta = 10.9 \pm 55.1 (n=5)$; 6 h: $\theta = 9.7 \pm 54.2 (n=3)$; 12 h: $\theta = -0.9 \pm 57.5 (n=3)$; 24 h: $\theta = -2.1 \pm 47.4 (n=3)$. mean ± S. D.; n: number of glass plate

Fig. 6 Typical examples of real time observations of the cell morphology. Perimeter of the cell and shape index were measured

より、細胞は図 6(a)～(c)のいずれの条件においても大きな周期で形態を変化させているのがわかる。おのおのの細胞周期は約 100 分で、負荷するせん断応力の大きさによって著しい差異は見られなかった。低密度分布状態とコンフルエント状態の中間の状態であるコロニーを形成した状態の内皮細胞に 2 Pa のせん断応力を負荷したときの、F-actin filament の蛍光顕微鏡写真を図 7 に示す。図 7(a)は静置培養、図 7(b)は流れ負荷 24 時間後の写真である。図 7(a)でコロニーの中心部の内皮細胞は、コンフルエント状態での静置内皮細胞の形態に似た比較的丸い形をしており、dense peripheral band も観察された。また、コロニーの周辺部の細胞は、他の細胞と接触していない部分で仮足を伸ばしているものが多く、中心部と比べて形態的にやや長細いものが多く観察された。それに対して 2 Pa のせん断応力を 24 時間負荷したものでは、中心部において細胞は流れの方向に伸長、配向する傾向があり、ストレスファイバも発達していた。しかし周辺部の細胞は、静置培養群同様その形態に顕著な変化は見られなかった。

ここで、細胞の周囲を完全に他の細胞に囲まれたコロニーの中心付近の細胞と、細胞の一部分(周長の 30～40%)だけが他の細胞と接触し、周囲を他の細胞に完全に囲まれていないものに分けて形態計測を行った。測定によって得られた shape index を図 8 に示

(a) Control

(b) After 24 h

200 μ m

Fig. 7 Typical photomicrographs of rhodamine-phalloidin stained bovine aortic endothelial cells before and after exposure to shear stress

す。実験回数はおおの 3 回で、1 回の実験で約 100 個の細胞について計測を行った。これよりせん断応力負荷前のコロニーの中心付近(center)の細胞は比較的丸い形状($SI=0.81\pm0.11$)をしているのに対し、負荷後では $SI=0.61\pm0.13$ と有意に ($p<0.05$) 伸長していた。ところが、コロニーの周辺部の細胞(periphery)ではせん断応力負荷前 ($SI=0.61\pm0.13$) と負荷後 ($SI=0.57\pm0.17$) では細胞の形状に有意な変化はなかった。コロニーを形成した状態の細胞の配向角の分布を図 9 に示す。静置培養下ではコロニーの中心部、周辺部において細胞の配向はそれぞれ、 $-4.3^\circ\pm51.8^\circ$ 、 $-4.7^\circ\pm49.5^\circ$ で両者とも配向はランダムで、場所による違いはなかった。しかし、せん断応力を 24 時間負荷したコロニーでは中心部で $1.0^\circ\pm13.4^\circ$ 、周辺部で $2.1^\circ\pm51.1^\circ$ で、中央部の細胞は静置培養群と比べ流れに配向していたが、周辺部では静置培養下で同様な分布を示した。

Fig. 8 Shape index of the endothelial cells under colony state conditions before and after exposure to shear stress. Control center: $SI=0.81 \pm 0.11 (n=3)$; Control periphery: $SI=0.61 \pm 0.13 (n=3)$; After 24 h center: $SI=0.61 \pm 0.13 (n=3)$; After 24 h periphery: $SI=0.57 \pm 0.17 (n=3)$. mean $\pm$ S. D.; n : number of glass plate

4. 考 察

本研究では低密度分布状態の内皮細胞に 2 Pa のせん断応力を 24 時間負荷し、時間経過ごとに細胞形状を測定したところ、内皮細胞の形態に有意な変化は見られなかった。Masuda と Fujiwara⁽¹⁰⁾ は、1 Pa のせん断応力を同様な状態の内皮細胞に負荷しても流れの方向に配向しないという結果を報告しており、本実験でも同様な結果が得られ、低密度分布状態の内皮細胞の形状は負荷するせん断応力の影響を受けないと考えられる。低密度分布状態とコンフルエント状態の間であるコロニーを形成した状態の内皮細胞に 2 Pa のせん断応力を 24 時間負荷した結果では、中心部の細胞が流れ負荷前と比べ有意に伸長、配向したが、周辺部の細胞は負荷前後で形状に違いが見られなかった。

著者らはコンフルエント状態の培養内皮細胞に対してさまざまな流れの条件下で実験を行い、細胞の反応について形態計測を行っている⁽¹³⁾。コンフルエント状態の静置培養下、および 2 Pa の定常的な一方向のせん断応力を負荷した内皮細胞の形態と、本実験の低密度分布状態での条件下で得られた内皮細胞の形態とを比較すると、全般的に本実験により得られた細胞の shape index のほうが小さい値となった。コンフルエ

Fig. 9 Histograms showing the angle of cell orientation under colony state conditions before and after exposure to shear stress. Control center: $\theta = -4.3 \pm 51.8 (n=3)$; Control periphery: $\theta = -4.7 \pm 49.5 (n=3)$; After 24 h center: $\theta = 1.0 \pm 13.4 (n=3)$; After 24 h periphery: $\theta = 2.1 \pm 51.1 (n=3)$. mean $\pm$ S. D.; n : number of glass plate

ント状態では shape index の値は、静置培養下、および 2 Pa のせん断応力を 24 時間負荷した後で、それぞれ 0.76 ± 0.13 , 0.39 ± 0.16 であった。低密度分布状態で shape index が小さいのは多くの細胞に仮足が存在していることと、全体的に細長い形状をしていることを反映した結果である。顕微鏡観察下で内皮細胞にせん断応力を負荷した細胞に周期的な細胞形状の変化が観察されたが、この細胞の運動を詳細に観察すると、細胞はせん断応力に抗して基質に接着し続けるために仮足を周囲に伸ばすようすが観察された。このようすから、内皮細胞は基質との接触面積をより増やそうと能動的に活動していることが推察される。コンフルエント状態の内皮細胞に 24 時間せん断応力を負荷した細胞では、流れの方向に配向した多くのストレスファイバが観察されたが、低密度分布状態の細胞では、ストレスファイバは観察されるものの、その配向は細胞の長軸に沿ったもので、F-アクチンフィラメントについてもコンフルエント状態の内皮細胞とは違ったようすが観察された。Girard ら⁽¹⁴⁾ の報告によると cytochalasin B によってあらかじめ F-アクチンフィラメントを破壊した細胞ではせん断応力による形態変化が起こらず、またせん断応力を負荷したときに細胞が基質からはがれやすいと報告している。低密度分布状態の細胞でせん断応力負荷後にストレスファイバが観察

されたことは、形態反応は起こさなかったものの、流れに抗して基質に接着し続けようとする能動的な反応が起こっているものと考えられる。

低密度分布状態の細胞がせん断応力負荷後に形態変化をおこさず、流れの方向に配向しなかったのと対照的に、コロニーの中心付近の細胞が一方向流によって伸長、配向したという反応は、コンフルエント状態の内皮細胞にせん断応力を負荷した場合の細胞の反応に類似している。また、コロニーの周辺部で他の細胞との接触がひじょうに少ない内皮細胞は、低密度分布状態での細胞の反応と同様であった。この細胞の反応の大きな違いは、細胞同士の接触の程度の違いが考えられる。内皮細胞は、基質や他の細胞に対して vitronectin receptor, fibronectin receptor や plakoglobin といった接着たんぱくを介して接着する。Girard ら⁽¹⁴⁾ は、培養内皮細胞にせん断応力を負荷すると基質との接着たんぱくである vitronectin receptor や vinculin の分布が変化し、細胞の上流側に多く観察されるようになり、さらに cytochalasin B によってあらかじめ F-アクチンフィラメントを破壊した細胞では基質との接着たんぱくが減り、さらにせん断応力による形態変化が起こらなかったと報告している。彼らは F-アクチンフィラメント、およびその末端に存在する接着たんぱくが内皮細胞のせん断応力による形態変化やせん断応力感知において重要な役割を演じている可能性を示唆している。内皮細胞では、基質への接着部と同様に細胞同士の接着たんぱくも F-アクチンフィラメントの末端に位置しており、vitronectin receptor や vinculin などの基質への接着たんぱくと同様に細胞同士の接着たんぱくも内皮細胞の形態変化やせん断応力感知において重要な役割を演じている可能性がある。

一般に付着性細胞はコンフルエント状態のように基質上に十分に増殖すると接触阻止(contact inhibition)が起こり増殖を停止する⁽¹⁵⁾。この状態では、細胞同士が全く接触していない低密度分布状態の細胞と細胞周期が明らかに異なる。増殖中の細胞は、M 期(細胞分裂期)、G₁ 期(第 1 間期)、S 期(DNA 合成期)、G₂ 期(第 2 間期)を順に繰返すが、接触阻止が起こり、増殖を停止した細胞は細胞周期が G₀ 期にある。したがって、低密度分布状態、およびコロニーの中心付近、周辺部での内皮細胞のせん断応力への反応の違いは、それぞれの状況下での細胞周期の違いが影響を及ぼしている可能性もある。

本研究によって得られた結果より、細胞-基質間の接着たんぱくだけでなく、細胞と細胞間の接着たんぱ

くも内皮細胞のせん断応力に対する形態反応に重要な役割を演じている可能性が考えられる。Fung と Liu⁽¹⁶⁾ も、内皮細胞はコンフルエント状態で隣接する細胞同士で周囲の力学情報を伝達しあって機能しているとし、細胞同士の接触の重要性を示している。したがって、生体内に存在するように隣接する細胞が完全に接触し、一層の敷石状態を形成することによって、内皮細胞は一つの組織として機能していると考えられる。しかし、現段階では細胞と細胞間の接着たんぱくの働きについては断定はできず、また、細胞増殖期の影響についても否定できず、内皮細胞の DNA 量の測定、細胞内情報伝達の詳細な解明、また、低密度分布状態やコロニーの周辺部などの形態変化を起こさない細胞について、細胞内カルシウムイオン濃度の測定など、形態以外の情報が不可欠である。

5. 結 論

血管内皮細胞は、細胞同士が全く接触していない低密度分布状態では、流れに対して配向や伸長を起こさず、また、周囲の細胞との接触の程度の違いによって、せん断応力に対し異なった形態反応を示すことが明らかとなった。

本研究は、文部省科学研究費補助金、国際学術共同研究「機械的刺激に対する血管内皮細胞の応答に関するバイオメカニクス」(課題番号 07044112)、同基盤研究 B(2)「動脈硬化発生の局在性に関する研究」(課題番号 08457199)の援助による。

文 献

- (1) Nerem, R. M., Levesque, M. J. and Cornhill, J. F., Vascular endothelial morphology as a indicator of the pattern of blood flow, *Trans. ASME, J. Biomech. Eng.*, **103** (1981), 172-176.
- (2) Okano, M. and Yoshida, Y., Endothelial cell morphometry of atherosclerotic lesions and flow profiles at aortic bifurcations in cholesterol fed rabbits, *Trans. ASME J. Biomech. Eng.*, **114** (1992), 301-308.
- (3) Levesque, M. J. and Nerem, R. M., The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress, *Trans. ASME J. Biomech. Eng.*, **107** (1985), 341-347.
- (4) Helmlinger, G., Geiger, R. V., Schreck, S. and Nerem, R. M., Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology, *Trans. ASME J. Biomech. Eng.*, **113** (1991), 123-131.
- (5) Frangos, J. A., *Physical Forces and the Mammalian Cell*, (1993), 223-248, Academic Press.
- (6) Cook, J. P., Stamler, J., Andon, N., Davies, P. F., McKinley, G. and Loscalzo, J., Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol, *Am. J. Physiol.*, **259** (1990), H804-H812.

- (7) Ando, J., Komatsuda, T. and Kamiya, A., Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells, *In Vitro Cell. Develop. Biol.*, **24**-9 (1988), 871-877.
- (8) Ookawa, K., Sato, M. and Ohshima, N., Change in the microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying a fluid-imposed shear stress, *J. Biomech.*, **25** (1992), 1321-1328.
- (9) Davies, P. F. and Tripathi, S. C., Mechanical stress mechanisms and the cell-An endothelial paradigm, *Circ. Res.*, **72** (1993), 239-245.
- (10) Masuda, M. and Hujiwara, K., Morphological responses of single endothelial cells exposed to physiological levels of shear stress, *Frontiers Med. Biol. Eng.*, **5** (1993), 79-87.
- (11) Shasby, D. M. and Shasby, S. S., Effects of calcium on transendothelial albumin transfer and electrical resistance, *J. Appl. Physiol.*, **60** (1986), 71-79.
- (12) Cornhill, J. F., Levesque, M. J., Herderic, E. E., Nerem, R. M., Kilman, J. W. and Vasco, J. S., Quantitative study of the rabbit aortic endothelium using vascular caste, *Atherosclerosis*, **35** (1980), 321-337.
- (13) Kataoka, N., Ujita, S., Ogawa, Y. and Sato, M., Flow direction affects shape and cytoskeletal structure of cultured bovine aortic endothelial cells, *Biofluid Mechanics Proceedings of the 3rd International Symposium*, (1994), 551-556.
- (14) Girard, P. R. and Nerem, R. M., Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins, *J. Cell. Physiol.*, **163** (1995), 179-193.
- (15) 井出利憲・兵頭昌雄, 15 章細胞周期, 細胞の培養技術, (1990), 325-343, 東京化学同人.
- (16) Fung, Y. C. and Liu, S. Q., Elementary mechanics of the endothelium of blood vessels, *Trans. ASME, J. Biomech. Eng.*, **115** (1993), 1-12.