HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象に関する実験的検討
Author(s)	内貴, 猛
Citation	北海道大学. 博士(工学) 乙第5618号
Issue Date	2000-03-24
DOI	10.11501/3168845
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/32689
Type	theses (doctoral)
File Information	5618.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文

血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象に関する実験的検討

北海道大学　大学院　工学研究科

システム情報工学専攻

内貴　猛

2000年3月

目　次

目　次 I

図表目次 IV

第1章 序論 1

1.1. 本研究の目的 1
1.2. 本論文の構成 2

第2章 研究の背景 3

2.1. 緒言 3
2.2. 動脈硬化症発症のメカニズム 6
2.3. 血流と動脈硬化の局在化 7
2.4. 血管内皮細胞の形態および機能におよぼす血流の影響 10
2.4.1. 血管内皮細胞の形態変化 11
2.4.2. 血管内皮細胞の生理活性物質の産生 11
2.4.3. 血管内皮細胞間接着蛋白の産生 12
2.4.4. 血管内皮細胞の電気生理学的反応 13
2.4.5. 血管内皮細胞の物質透過性 13
2.5. リポ蛋白の流速依存性濃縮現象 14
2.6. 壁近傍の分子濃度測定方法 17
2.6.1. 水透過速度測定法 17
2.6.2. 顕微共焦点蛍光分光法(Confocal fluorescence microspectroscopy) 18
2.6.3. 顕微共焦点吸光分光法(Absorption-mode confocal microspectroscopy) 19
2.6.4. 光音分光法(Photoacoustic spectroscopy) 19
2.6.5. 顕微熱レンズ分光法(Photothermal microscopy) 20
参考文献 22

第3章 水透過速度測定による培養血管内皮細胞単層表面上における巨大分子の流速依存性濃縮現象の解析 26

3.1. 緒言 26
3.2. 試料および方法 28
3.2.1. 血管内皮細胞の培養 28
3.2.2. 培養血管内皮細胞単層の作製 28
3.2.3. 水透過速度測定装置および灌流装置 31
3.2.4. 灌流液 34
3.2.5. 実験手順および解析 34
3.3. 実験結果 36
3.3.1. 水透過速度におよぼす灌流液中巨大分子濃度の影響 36
3.3.2. 水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響 38
3.3.3. 水透過速度におよぼす巨大分子の大きさの影響 43
3.4. 考察 45
3.4.1. 細胞単層表面上における巨大分子濃度の推定方法について 45
3.4.2. 細胞単層における水透過速度に影響をおよぼす要因について 45
3.4.3. リポ蛋白の見かけ表面濃度の流速による変化 46

3.4.4. 巨大分子の大きさの影響 47
3.5. 結言 49
参考文献 50

第4章 水透過速度測定による半透膜内表面上における巨大分子の流速依存性濃縮現象の解析 52

4.1. 緒言 52
4.2. 実験方法 53
4.2.1. 水透過速度測定装置および灌流装置 53
4.2.2. 灌流液 55
4.2.3. 実験手順および解析 55
4.3. 実験結果 57
4.3.1. 水透過速度におよぼす流量の影響 57
4.3.2. 水透過速度におよぼす灌流液中における巨大分子の濃度の影響 60
4.3.3. 水透過速度におよぼす巨大分子の大きさの影響 61
4.3.4. 水透過速度におよぼす灌流流量の影響の可逆性について 63
4.4. 考察 64
4.4.1. 透析膜内表面近傍における巨大分子の濃度 64
4.4.2. 流れ(主流)の方向に沿った水透過速度の変化 64
4.4.3. 巨大分子の濃縮現象について 65
4.4.4. 巨大分子の大きさと濃縮度合いとの関係 65
4.4.5. 水透過速度におよぼす灌流の影響についての他の報告例との比較 66
4.4.6. 水透過速度の経時的な減少の要因 67
4.4.7. 培養血管内皮細胞を用いた場合の実験結果との比較 67
4.5. 結言 69
参考文献 71

第5章 蛍光強度測定による巨大分子の流速依存性濃縮現象の解析 72

5.1. 緒言 72
5.2. 試料および方法 73
5.2.1. 試料, 灌流装置, 蛍光微粒子および灌流液 73
5.2.2. 蛍光強度測定装置 73
5.2.3. 実験方法および実験データの解析方法 75
5.3. 実験結果 78
5.3.1. 巨大分子の壁近傍濃度におよぼす灌流圧の影響 78
5.3.2. 巨大分子の壁近傍濃度におよぼす流速の影響 79
5.4. 考察 89
5.4.1. 蛍光強度測定により微粒子の濃度を求める方法について 89
5.4.2. 培養内皮細胞単層による巨大分子の取り込みにおよぼす灌流圧力の影響 90
5.4.3. 培養内皮細胞単層による巨大分子の取り込みにおよぼす流速(流量)の影響 94
5.4.4. 培養内皮細胞単層による巨大分子の取り込みにおよぼす他の現象の影響 95
5.5. 結言 97
参考文献 98

第6章 本研究の結論 99

謝辞 102
発表論文 103

図表目次

図2-1. ヒトの動脈硬化病変の発生パターン 5
図2-2. リポ蛋白の流速依存性濃縮現象 16
図2-3. 顕微共焦点蛍光分光法の光学系 18
図2-4. 顕微共焦点吸光分光法の光学系 19
図2-5. 光音分光測定装置のブロックダイアグラム 20
図2-6. 光熱レンズ法を用いる 4 つの測定原理 21
図3-1. 実験に使用した血管内皮細胞単層の写真 30
図3-2. 灌流装置の模式図 32
図3-3. 実験装置の外観写真 33
図3-4. 水透過速度におよぼす灌流液中の血清濃度の影響 37
図3-5. 血清を含まない灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響 39
図3-6. 体積濃度 20 %の血清を含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響 40
図3-7. 血清を灌流液として用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響 41
図3-8. 種々の灌流液についての水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響 42
図3-9. リポ蛋白あるいはアルブミンのみを含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響 44
図3-10. 血清の見かけ表面濃度におよぼす壁せん断速度の影響 48
図4-1. 水透過速度測定装置の縦断面図 53
図4-2. 灌流装置の概略図 54
図4-3. 血清を含んだ灌流液を用いた場合の透析膜における水透過速度の時間変化 58
図4-4. 水透過速度におよぼす灌流液中の血清濃度の影響 60
図4-5. リポ蛋白あるいはアルブミンのみを含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響 62
図4-6. 水透過速度におよぼす灌流流量の影響の可逆性 63
図5-1. 灌流装置の模式図 74
図5-2. 蛍光強度におよぼす圧力の影響 78
図5-3. 蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響 81
図5-4. 蛍光強度におよぼす低壁せん断速度の影響 82
図5-5. 体積濃度 20 %の血清を含んだ灌流液を用いて実験した後の内皮細胞単層の蛍光顕微鏡写真 83
図5-6. 血清を灌流液として用いた場合の蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響 84
図5-7. 血清を灌流液として用いて実験した後の内皮細胞単層の蛍光顕微鏡写真 85
図5-8. 蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響 87
図5-9. 血清を含んでいない灌流液を用いて実験した後の内皮細胞単層の蛍光顕微鏡写真 88
図5-10. 蛍光強度の校正線 90
図5-11. 濃縮蛍光強度におよぼす灌流圧の影響 92
図5-12. 蓄積蛍光強度におよぼす灌流圧の影響 93
図5-13. 濃縮蛍光強度におよぼす水透過速度の影響 93

図5-14. 濃縮蛍光強度と蓄積蛍光強度との関係 94

表2-1. 内皮細胞に力学的刺激を与えた場合の生理活性物質産生能の変化 12
表2-2. 内皮細胞に力学的刺激を与えた場合の接着蛋白産生能の変化 13
表4-1. 水透過速度におよぼす灌流流量の影響 59
表5-1. 濃縮蛍光強度および蓄積蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響 95

第1章 序論

1.1. 本研究の目的

近年，我が国においては脳出血が減少し，脳梗塞が相対的に増加している．また，心臓においては心筋梗塞が徐々に増加する傾向を示している．これら脳梗塞，心筋梗塞は，ともにそのほとんどが動脈硬化症による狭窄ないし閉塞が原因で起こる．血栓が流れてきて閉塞させる場合が多いが，その場合においては，その上流部における動脈硬化病変がその血栓の発生源になっている．この様なことから，動脈硬化症発症のメカニズムを明らかにすることは，心筋梗塞などの重篤な疾病の治療や予防，診断へ寄与することから重要なことである．また，生体における力学現象を明らかにする意味で学術的に非常に興味を引かれる問題である．動脈硬化症進展のプロセスは病理学的な研究からある程度明らかになっているが，発症のメカニズムについては未だはっきりしていない．これを明らかにするための一つの手がかりが，病変発症の局在性である．すなわち，局在化のメカニズムを調べることにより病変発症のメカニズムを解明することができると考えられる．これを明らかにするために，動脈硬化好発部位における血流の計測・解析が行われ，病変発症に関与している流体力学的なパラメータを明らかにする研究が多数行われた．その結果，壁せん断応力が平均的に低く，時間的変化の大きいことが病変発症に最も関与していることがわかった．そして，血液の流れが病変発症に関与するメカニズムに関して幾つかの説が提唱された．その中で，著者の所属する研究グループが提唱しているリポ蛋白の流速依存性濃縮現象は，リポ蛋白の血管壁内への取り込みの変化を引き起こす現象として最も説得力のある説である．しかし，この現象が実際に血管内で起こっているかどうかはまだわかっていない．本論文は，上述の巨大分子の流速依存性濃縮現象が実際に血管内で起こっていることを実験的に実証すべく行った一連の研究の成果をまとめたものである．

1.2. 本論文の構成

本論文ではまず，第２章において本論文に記述した一連の研究を始めるに至った背景を記した．そして，第３章では，血液と直接接触する血管壁における血管内皮を対象として，巨大分子の流速依存性濃縮現象が起こることを実験的に証明することを試みた．そして，第４章では，第３章で得られた結論をさらに確実にするために，細胞のない半透膜においても同じ結果が得られるかどうかを調べた．これらの章では，一定差圧の下での管壁における水透過速度の変化を調べることにより，巨大分子の表面濃度を推定する間接的な方法を用いた．第５章では，巨大分子の壁面近傍における濃度を直接測定する試みとして，蛍光物質で標識した微小粒子の濃度を蛍光顕微鏡を用いた蛍光強度測定装置で測定する方法により，巨大分子の流速依存性濃縮現象を調べた．これらの一連の研究を通して，第６章の結論を導き出した．

第2章 研究の背景

2.1. 緒言

本論文は，動脈硬化症の発症のメカニズムを明らかにするために行った一連の基礎的な研究についてまとめてある．本章ではまず，これらの研究をはじめるに至った背景について記述する．また，２.６ には本論文中の実験で用いた計測手法を選定するに至った理由を記した．

動脈硬化症は，心筋梗塞や脳梗塞といった形で現在ヒトの生命を脅かしている重篤な臓器障害の原因となる血管病であり，死因の 33 %を占める（厚生省統計資料，1998）循環器疾患の主体をなしている（山本章, 1994）．この動脈硬化症がどのようなメカニズムで発生するのかを明らかにするための研究は，かなり以前から多く行われ，現在では生理学，病理学，生化学，免疫学，流体力学，材料力学等の広範に渡る領域において行われているにもかかわらず，未だに定説がない状態である．

動脈硬化症が病理学的に進展していく過程については，次節で説明するようによくわかっている．また，発症を促進させる危険因子についてもある程度わかってきた．さらに，その危険因子が血管壁細胞に作用したときに起こる生化学的な変化についてもかなりわかってきた．しかし，動脈硬化症には，動脈系のほぼ決まった場所にしか発症しないという非常に重要な特徴がある．もし，生化学的な因子が発症現象を支配しているのであれば，危険因子が多数存在した場合には動脈全体で病変が進展していてもおかしくない．この矛盾が発症のメカニズムをわかりにくくしている．

図２-１に示したように，動脈硬化症は，大きな動脈の分岐部に好発することがわかる．図には示しきれていないが，冠動脈や大腿動脈等の血管が彎曲した部分にもよく発生する．これらの好発部位をさらによく観察すると，分岐部の側壁，彎曲部の内彎側が主である．この様な部位は，血流に渦や逆流，二次流れが発生し，複雑な流れになっていると思われる．すなわち，血流も何らかの形で動脈硬化の発症に関与していることになる．このメカニズムを探ることにより，動脈硬化症発症の機序の全容を解明できると思われる．

血流が生化学的現象を修飾するメカニズムを解明するためには，血流の何のパラメータが実際に関与しているのかと言うことと，そのパラメータによってどのような生化学現象が制御されているのかを明らかにしなければならない．前者については 1960 年代から現在までに行われたかなりの数の研究により，ほぼ明らかになってきた．私自身もそれを調べる研究に従事していた． 2.3 において，私の行った研究の結果を中心に，動脈硬化症の発症や進展に及ぼす血流のパラメータについて説明する．現在では主に後者についての関心が深まっていて，本論文もそれを明らかにするために行った研究の報告である．後者を明らかにする研究では，主に血流に直接さらされる血管内皮細胞を含む血管内皮における現象を扱っている．内皮細胞の形態や機能におよぼす血流の影響について，今までに明らかになっている事柄については 2.4 に記した．しかし，動脈硬化の発症において最も重要な生化学物質であるリポ蛋白の血管壁内への取り込みにおよぼす血流の影響に関してはほとんどわかっていない． これが明らかになれば，動脈硬化症発症のメカニズムの全容がわかり，心筋梗塞などの重篤な疾病の治療や予防，診断へ役立つことになると期待される．

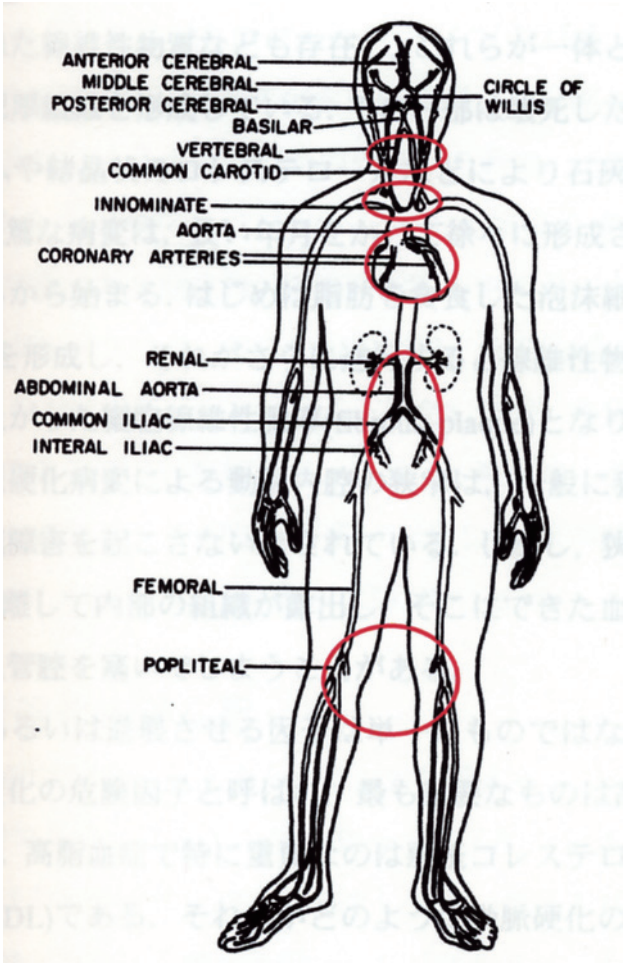

図２-１．ヒトの動脈硬化病変の発生パターン

黒く塗りつぶしてある部分に動脈硬化病変がよく発生する．(from Spain, 1966)

2.2. 動脈硬化症発症のメカニズム

動脈硬化の病変部には，血管内腔側に一層の敷石状になって存在する血管内皮細胞と，その真下にある基底膜との間に血液由来の蛋白質やコレステロールを多量に含有するリポタンパク質が蓄積している．そして，それらを貪食しようとしてマクロファージや平滑筋細胞がそれぞれ血液側と中膜側より遊走し，脂質を多量に取り込んで泡沫細胞となったものが存在する．また，遊走してきて増殖を始めた平滑筋細胞により分泌された線維性物質なども存在し，これらが一体となって内腔側に盛り上がった粥状の肥厚組織を形成している．その一部は壊死した細胞やそれから放出されたカルシウムや結晶状のコレステロールなどにより石灰化している場合もある．このような重篤な病変は，長い年月をかけて徐々に形成され，その初期の病変形成は小児期ごろから始まる．はじめは脂肪を貪食した泡沫細胞の集合が軽い内膜肥厚(fatty streak)を形成し，それがさらに進行すると線維性物質の含有量が増大し，局所的に盛り上がった細胞線維性肥厚(fibrous plaque)となり，重篤な病変へと移行して行く．動脈硬化病変による動脈内腔の狭窄は，一般に狭窄率が 75 %を超えないと重篤な血流障害を起こさないとされている．しかし，狭窄率がそれ以下の狭窄でも，内皮が剥離して内部の組織が露出し，そこにできた血栓がはく離して下流に流れていって血管腔を塞いでしまうことがある．

動脈硬化を発症あるいは進展させる因子は単一のものではなく，多因子よりなる．それらは動脈硬化の危険因子と呼ばれ，最も重要なものは高脂血症，高血圧，喫煙，糖尿病である．高脂血症で特に重要なのは悪玉コレステロールと呼ばれている低密度リポ蛋白(LDL)である．それらがどのように動脈硬化の発症や進展に関与するかについては，Ross (1986)の提唱した傷害反応説が主に病理学者の間で広く受け入れられている．ここでリポ蛋白について少し説明しておくことにする．血中ではコレステロールは主にリポ蛋白の中に含まれて存在している．リポ蛋白は比重の違いにより HDL, LDL, ILDL, VLDL に分けられ，これは密度の高い順である．この密度差はコレステロールの含有量の違いによる．また，これらの分子は大きさも異なり，VLDL が最も大きい．LDL が一般的に悪玉コレステロールと呼ばれることは

既に述べたが，善玉コレステロールと呼ばれているのはHDLである．すなわち，LDLは動脈硬化病変を促進し，HDLは抑制すると言われている．

Rossらによって提唱された傷害反応説は1976年にはじめて発表されたが，1986年，1993年に相次いで改訂されている．彼らの仮説によると，危険因子，特に酸化LDLにより血管内皮が傷害を受け，種々の接着因子を発現し，単球やTリンパ球がそこに接着する．さらにこれらの細胞は走化因子により内皮下に遊走し，単球はマクロファージに分化する．マクロファージやTリンパ球，平滑筋細胞は酸化LDLを貪食し，泡沫細胞となり，みずからも成長因子を分泌しつつ脂肪斑を形成する．また，ある場合にはそれらの細胞が内皮細胞を刺激，損傷して血小板の粘着を起こす．粘着した血小板やマクロファージ，また損傷を受けた内皮細胞からPDGFなどの細胞増殖因子が分泌され，平滑筋細胞の中膜から内膜への遊走が起こり，細胞線維性肥厚が形成される．彼らの仮説では，各細胞間の相互作用，各細胞から産生される種々の増殖因子，サイトカインを含む接着，走化因子の関わりをよく説明している．しかしながら，高脂血症，高血圧，糖尿病，喫煙などによる内皮細胞の損傷機序については未だ不明な点が多い．特に，血管の特定の部位でしか病変が発症しないことについては全く説明がなされていない．

2.3. 血流と動脈硬化の局在化

動脈硬化症が局所的に発症する理由として，2つ考えられている．1つは2.1で述べた血流の影響であり，もう1つは動脈壁の先天的な特性が場所により異なり，ある特定の場所は予め動脈硬化病変が発生しやすい性質を持っているという考えである．動脈壁の種々の特性を調べる研究が最近になって行われるようになってきて，動脈硬化症が発症しやすい場所の物質（特にLDL）透過性や代謝速度が他の部位と異なる (Berceli et al., 1990) などの研究結果が報告されている．しかし，それらの動脈壁の特性の違いは先天的に備わっていたのではなく，血流条件により発生したと考えられている．すなわち，これらの研究も結果的には上記のうちの前者の考えに従う結果を示していて，先天的に動脈壁の特性が異なっていることを示した研究は全くない．

一方，血流による影響については1960年代から幾つかの説（血行力学説）が提案されてきた．主なものは，血管内の局所内圧低下が内皮細胞を吸引することにより動脈硬化が起こるとする内皮吸引説 (Texon et al., 1960)，血管内の乱流が内皮細胞を損傷するとする乱流説 (Wesolowski et al., 1965)，流れの剥離により血流に淀みが生じ脂質が沈着するとする流れの剥離説 (Fox and Hugh, 1966)，血流が動脈壁におよぼす壁せん断応力の影響を重要視したせん断応力説 (Fry, 1968; Caro et al., 1971) である．これらのうち現在でも重要視されているのが Caro et al. (1971) の提唱した低せん断応力説である．これは，壁せん断応力の低い領域で血管壁内から血液への脂質の輸送が減少し，血管壁内外の脂質輸送の平衡が崩れ，結果として血管壁内に脂質が蓄積するという説で，現在でも多くの研究者の支持を得ているが，動脈硬化発症のメカニズムを真に説明できるものではない．なぜなら，以前の説も含め，血行力学説は実際の発症部位とモデル実験による流れの計測との比較結果を主張のよりどころとしているが，例えば動脈分岐部では剥離，高せん断，低せん断領域が隣接していて，どの因子が関与しているのかを判断するのが難しい．また，モデル実験における技術的な制限により，動脈内の流れを正確に再現できなかったり，モデル内の流れを正確に測定できなかった．

Karino and Motomiya (1983) は，動脈自体を組織固定し，透明化した動脈を用いることによって，血管壁の厚さと複雑な形状を持つ動脈内の流れを同時に観察，測定した．そして，幾つかの部位の動脈内の流れを，同じ手法を用いて観測し，壁せん断応力の低い部位と血管壁が厚い部位が一致していることを報告した(Motomiya and Karino, 1984; Asakura and Karino, 1990; Endo et al., 1996).

Ku et al. (1985) は早くから血流の拍動性に着目し，頸動脈分岐部のガラス管モデルを用いた実験により，内膜肥厚の厚さが最大壁せん断応力の逆数や平均壁せん断応力の逆数の他にも，壁せん断応力の方向が反転する度合いを示す振動せん断インデックス (oscillatory shear index, OSI) にも良く相関することを報告した．また，Friedman et al. (1981) はヒト大動脈分岐部の鋳型モデルを用いて同様の実験を行い，内膜肥厚の厚みが壁せん断速度の変動幅に反比例することを報告したが，Friedman et al. (1986) では，内膜肥厚は初期段階では高壁せん断応力部で速く進み，

途中から低壁せん断応力の部位における内膜肥厚がこれを越えて進行するという観察結果を報告している.

技術は常に進歩しているし,簡単には実現できなくても能力と努力があれば可能になることもある.私は,大学院の修士課程 (内貴, 1990; 内貴ら, 1990; Matsumoto et al, 1992, 1994), 博士後期課程時代 (内貴猛ら, 1994; Naiki et al.,1995; 内貴猛ら, 1995; Hayashi et al., 1996) に現在の技術で可能な限りに厳密で正確なモデル実験を確立し,時間分解能,空間分解能の最も高い3次元レーザ流速計を用いて動脈分岐部内の流れを計測する研究に取り組んだ.

従来のモデル実験では再現できなかった条件とは,動脈血流の拍動性,血液の非ニュートン性,複雑な血管形状,血管壁の弾性の4要素である.私の研究では,定常流を発生させるのに通常使うオーバーフローヘッドタンクを用いた循環流路に圧力平滑化用コンプライアンス・チャンバとピストンポンプを取り付け,その動きをコンピュータで制御することにより,動脈血流と同じ流量波形と圧波形を持つ流れを作製することに成功した.溶液の非ニュートン性については,溶液中に天然高分子であるキサンタンガムを混入することにより,静的粘性特性のみならず,動的粘弾性特性をも血液に類似させることができた.複雑な血管形状の再現には,動脈内腔の鋳型を作り,動脈の複製を作るというキャスティング法で実現した.また,動脈の複製を作る際の材料にポリウレタンを用いることによりモデルに弾性を持たせることに成功した.それらの粋が Hayashi et al. (1996) に集約されている.そして動脈硬化病変のほとんどない54歳女性の大動脈分岐部内の32箇所における内膜厚さと壁せん断応力の関係を調べたところ,分岐直後の部位では平均内膜厚さは192 μm であり,壁せん断応力との間に弱い負の相関があるものの,それ以外の部位では平均内膜厚さは343 μm であり,壁せん断応力と内膜厚さの間に強い正の相関があることがわかった.言いかえると,内膜の比較的薄い分岐直後の部位については,従来の研究で報告されているように,壁せん断応力が低い部位ほど内膜は厚いが,内膜がそれより厚い他の部位では全く正反対の関係があることがわかった.すなわち,部位によってあるいは病変の進展度合いによって,病変の進展を支配しているメカニズムが異なっている可能性があることがわかった.この研究のようなほぼ完全に動脈内の血流を再現した研究は他にはないため,他の研究の結果と合わ

せて深く考察することはできなかったが，実際の血流は非常に複雑であり，それを正確に再現しなければ，かなり異なった結果を得ることになることがわかった．

動脈内の血流はかなり複雑であり，動脈硬化病変の発症や進展は，いくつもの現象が重ね合わさって起こっていると考えられる．次節には血管の最も内腔側に位置する血管内皮細胞の血流条件による変化をまとめたが，今までででもかなりの種類の変化が起こることがわかっている．それらの中に動脈硬化病変の発症や進展に関与している機能の変化も含まれていると考えられ，そのような現象の重ね合わせの結果，病変が発症したり進展していくと思われる．重要なのは，どの現象が最も強く病変の発症や進展に関与しているのかを明らかにすることである．そのためには，それぞれの現象を単独で調べることができる実験系を用いることが必要である．第４章で述べる透析膜を用いた実験系や第３章，第５章で述べる培養内皮細胞単層を用いた実験系もそのような実験系の一つである．そして，将来はこのような多くの研究の結果をまとめあげて因果関係や結びつきの強さを明らかにすることが可能になると思われる．

2.4. 血管内皮細胞の形態および機能におよぼす血流の影響

血管壁の最も内腔側に一層になって存在する血管内皮細胞は，唯一血液と直接接触する細胞であり，生体にとって重要な生理機能を数多く有している．例えば，血管内皮細胞は血管平滑筋を弛緩させるプロスタサイクリンや NO（一酸化窒素），反対に平滑筋を収縮させるエンドセリンやトロンボキサン A_2 などを産生して，生体の恒常性の保持に不可欠な血圧の調節を行っている．この他にも，血管内皮細胞は血液中の水分や蛋白の血管外組織への供給の制御，血液の凝固を抑制する物質や，血管新生や血管のリモデリングに重要な役割を果たす各種の細胞増殖因子の産生・分泌，あるいは他の細胞との相互作用に関わる細胞外マトリックスや接着分子の産生など，様々な機能を有している．

血管内皮細胞にはさらにもう一つ重要な特徴がある．それは，血管内皮細胞が血液の流れの状況を感知していると思われる点である．この特殊な環境において細胞がどのような役割を担っているのかを調べるために，多くの研究者が，流れに起因するせん断応力といった物理的刺激が血管内皮細胞の様々な機能におよぼす影響

について研究している．ここでは，血流による影響を中心に，血管内皮細胞の物理的な刺激に対する形態的，機能的応答について，今までわかっている現象を紹介する．

2.4.1. 血管内皮細胞の形態変化

血管内皮細胞がせん断応力を負荷することにより細長くなり，流れの方向に配向することは，Franke et al.(1984) 等の研究によりよく知られている．この変化は，負荷するせん断応力の大きさや負荷している時間に依存する．また，細胞を培養する基質やその基質にコートする細胞外マトリックスの種類にも依存する．このような流れの負荷に対する細胞形状の変化は，細胞内の構造物である細胞骨格，特にアクチンフィラメントが流れに対して反応することによって現れていることが示唆されている (Ookawa et al., 1994)．また，せん断応力を負荷した際に，細胞が基底膜と接着する接着斑の位置が流れの上流側に移動し，細胞質内に存在するヴィンキュリンと呼ばれる分子も同時に上流側にシフトすることが蛍光抗体染色法で観察されている (Wechezak et al., 1989)．これも細胞形態の変化を引き起こす一因であると思われる．

流れに対する細胞形態の変化は，層流，乱流，定常流，拍動流などの流れの状態によっても異なる．この性質を利用し，動脈内の血管内皮細胞の形態を観察することにより動脈内の流れを調べる研究もなされている (Nerem et al., 1981; Sato and Ohshima, 1994)．このように血管内皮細胞は，流れによる物理的刺激に反応し，ダイナミックにその形態を変えるのである．

2.4.2. 血管内皮細胞の生理活性物質の産生

内皮細胞の産生する多くの生理活性化物質の産生能が流れの影響を受けることが表2-1に示したようにわかっている (佐藤, 1996). 血管を収縮させるエンドセリンの産生能については，せん断応力の負荷により促進されるという報告 (Yoshizumi et al., 1989) と抑制されるという報告 (Nollert, 1991) があり，定かではない．また，エンドセリンと逆の作用をもち，血管径を拡張させるEDRF（血管内

皮由来弛緩因子）の産生が促進されることが示されている (Cooke, 1990; Buga, 1991).

表2-1. 内皮細胞に力学的刺激を与えた場合の生理活性物質産生能の変化

（佐藤, 1996）

エンドセリン	↑ ↓
EDRF	↑
PGI_2	↑
PDGF	↑ →
ATP	↑
サブスタンスP	↑

↑: 促進・増加, ↓: 抑制・減少, →: 不変

2.4.3. 血管内皮細胞間接着蛋白の産生

現在までわかっている内皮細胞の接着蛋白産生能におよぼすせん断応力の影響をまとめると表2-2のようになる. ファイブロネクチンは内皮細胞が基底膜側へ分泌している細胞外マトリックスの主要な成分の一つであり, 血管内皮細胞が基質と接着する上で重要な役割を果たす. この接着蛋白の産生はせん断応力負荷直後には抑制される (Gupte and Frangos, 1990). しかし, 細胞の配向と同時に内皮細胞下のファイブロネクチンも明らかにせん断応力の影響を受けて配向している (Wechezak et al., 1985) ことから, せん断応力負荷後の時間経過に依存して産生能が変化していると考えられている.

一方, 血管内皮細胞へのリンパ球の接着は, せん断応力の負荷した後では低下する. これは, 接着分子の一つである VCAM-1 の産生がせん断応力の負荷により抑制されたためである (Ando et al., 1994). これに対し, 別の接着蛋白である ICAM-1 や CD44 の産生に影響はない.

表2-2．内皮細胞に力学的刺激を与えた場合の接着蛋白産生能の変化

ファイブロネクチン	↑↓
IL-6	↓
ヒスタミン	↑
VCAM-1	↓
ICAM-1	→
CD44	→

↑: 促進・増加, ↓: 抑制・減少, →: 不変

2.4.4. 血管内皮細胞の電気生理学的反応

細胞内で信号を伝達する細胞内セカンドメッセンジャーと非常に密接に関連しているイオンに，カルシウムイオンがある．細胞内カルシウムイオン濃度におよぼすせん断応力負荷の影響については比較的多くの研究が行われている．せん断応力の負荷に伴って，細胞内カルシウム濃度は上昇する (Ando et al., 1988) が，この変化にはATPが必要であるという報告 (Dull and Davies, 1991; Mo et al., 1991) と必要ないという報告 (Shen et al., 1992; Geiger et al., 1992) があり，はっきりしていない．また，表2-1にあげたようなPGI_2（プロスタサイクリン）やEDRFの産生の増加は，細胞内カルシウムイオン濃度の増加の二次的な影響として現れた可能性が指摘されている．

2.4.5. 血管内皮細胞の物質透過性

血管壁を構成している細胞への栄養は，主に内腔からの透過・輸送によって供給されているため，血管壁内の物質輸送，あるいは血管壁内への取り込みを明らかにする研究が多く行われている．それらの研究が対象としている物質は，血液中の水分，アルブミン，リポ蛋白（特にLDL）等である．しかし，それらの物質輸送におよぼすせん断応力の影響についてはあまり研究されていない．

Caro et al. (1985) は，1 %あるいは4 %のアルブミンを含んだクレブス・リンゲル液を用いたときの家兎総頸動脈における水透過流量が灌流することによって1.3倍に増えることを報告している．また，Howard et al. (1995) は，培養内皮細胞単層と1 %のアルブミンを含んだ細胞培養液を用い，10 dynes/cm^2 のせん断応力の負荷によって水分の透過率が2.16倍に増加したと報告している．

アルブミンの透過に対するせん断応力の影響については，Jo et al. (1991) が Howard et al. (1995) と同じ試料を用い，せん断応力の負荷によって透過性が増加し，その増加量はせん断応力の大きさに依存することを明らかにした．また，Sprague et al. (1987) は培養内皮細胞単層へのLDLの取り込みを調べ，せん断応力の負荷によりその量が増加することを示した．ところが Fry et al. (1986) は，内皮を剥離したミニブタ大動脈壁とミニブタ血清を用い，24 時間の間に血管壁内へ入り込むアルブミンとLDLの量が溶液の攪拌により減少し，その減少割合はLDLの方が大きかったと報告している．彼らはまた，内皮表面の液体中におけるそれらの巨大分子の濃度を測定し，攪拌によりその濃度が減少していることを見出した．一方，Davies et al. (1984) は HRP (horseradish peroxidase) をトレーサとして培養内皮細胞のエンドサイトーシスにおよぼすせん断応力の影響を調べ，せん断応力の時間的な変化が影響を及ぼしていることを報告している．この様に，血管壁あるいは血管内皮細胞への物質の透過におよぼす物理的刺激の影響についてはまだはっきりとわかっていないのが現状である．

2.5. リポ蛋白の流速依存性濃縮現象

内皮細胞の機能が変化するのとは異なる現象であるが，血流が動脈硬化病変の発生や進展，さらには血管壁の組織構造にも関与するメカニズムの1つとしてリポ蛋白の流速依存性濃縮現象が考えられている．

動脈壁は血漿内の水分を通しやすいが血漿蛋白やリポ蛋白のような巨大分子を通しにくいという半透性を示す．そのため，これらの巨大分子に対して分子ふるいのように振る舞うことになる．そうすると，血液と血管内皮の境界でのリポ蛋白の濃度が高くなり，濃縮が起こることになる．ちょうど，懸濁液をろ過すると，ろ紙

表面に懸濁物質が集まり，濃度が高くなることと同じである．この考えはColton et al. (1972) により初めて示され，リポ蛋白の濃度分極 (concentration polarization of lipoproteins) と呼ばれている．

血液と血管内皮の境界でのLDLの濃縮度合いは，Colton et al. が示したように血管壁における水分の透過速度によって決まるだけではなく，図２-２に示したように主流方向の血流速度にも依存していると考えられる．すなわち，血管内皮表面上でのリポ蛋白濃度は，その部位における局所血流速度，動脈入り口からの距離，血圧に依存する血管壁における水透過速度，および血液中におけるリポ蛋白分子の拡散速度によって決定されていると考えられる．

透過壁面における血漿蛋白の濃度におよぼす水透過速度や灌流流速の影響に関しては，透析技術の開発段階において多くの研究がなされている (Blatt et al, 1970). しかし，その考えを動脈に当てはめ，動脈内の条件下でもその現象が起こり，動脈硬化病変の局所的な発症に関与していると考えられるようになったのは．ごく最近の事である．この現象に関してKarino and Deng (1990, 1993, 1995a), Deng et al. (1995b), Wada and Karino (1999) は，数値計算によりリポ蛋白の血管内皮表面上における濃度におよぼす灌流速度と血管壁における水透過速度の影響について検討した．その結果，リポ蛋白の壁面濃度は血流速度を高くするほど減少，水透過速度を高くするほど増加，血管入り口から距離が長くなるほど増加，リポ蛋白の拡散係数が小さく（分子径が大きく）なるほど増加すると報告している．この現象は，上記の研究者らにより巨大分子の流速依存性濃縮現象と呼ばれている．

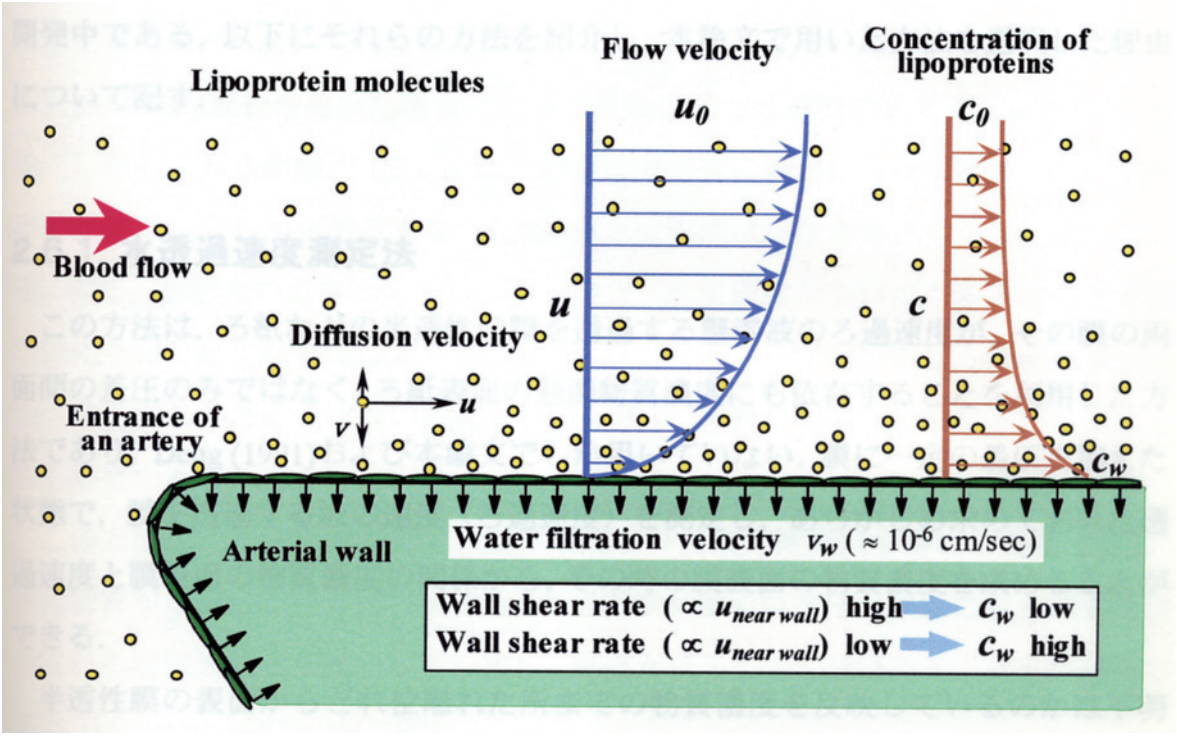

図２-２．リポ蛋白の流速依存性濃縮現象

Lipoprotein molecules in blood are transported with a velocity which was determined as a vectorial sum of the axial (u) and radial (v) component of the translational velocity of the fluid (blood) and the diffusion velocity of lipoprotein molecules. Since the fluid radial velocity (v) is the highest at the surface of the arterial wall due to the presence of a filtration flow (v_w), molecules located near the vessel wall are carried closer to the wall. As a result, concentration of lipoprotein molecules builds up near the wall, and it becomes the highest at the luminal surface of the vessel wall. At the same time, lipoprotein molecules are also carried distally by the axial fluid velocity (u). Thus a concentration boundary layer is formed at the luminal surface of the arterial wall, where surface concentration of lipoprotein molecules (c_w) increases with distance from the entrance of the artery or the flow divider of a bifurcation. It is expected that enriching of lipoprotein molecules occur at the luminal surface where near wall fluid axial velocity ($u_{near\ wall}$; it is proportional to wall shear rate and wall shear stress) is low and/or blood pressure which alters the permeability of the wall (v_w) is high.

2.6. 壁近傍の分子濃度測定方法

巨大分子の濃縮は，血管壁と血管壁から血管半径の 1/100 程度離れた内腔側との間の領域で起こっていると考えられる (Wada and Karino, 1999). 間隙が 0.5 mm の平行平板型流路の場合であれば，ほんの 5 μm 程度の厚さの濃縮層（濃度境界層）が生じていることになる．この濃縮層における巨大分子の濃度分布を測定するには，少なくとも 1 μm の深さ方向の分解能が必要である．この性能は現在の技術では非常に厳しい基準であり，この性能を実現しうる測定方法のほとんどは現在研究開発中である．以下にそれらの方法を紹介し，本論文で用いた方法を選択した理由について記す．

2.6.1. 水透過速度測定法

この方法は，ろ紙などの半透性の膜を透過する懸濁液のろ過速度が，その膜の両面間の差圧のみではなく，ろ紙表面の懸濁物質濃度にも依存することを利用した方法であり，Deng (1991)および本論文でしか用いていない．膜に一定の差圧を加えた状態で，膜を透過する液の速度（ろ過速度）を測定し，あらかじめ求めておいた透過速度と膜表面の物質濃度の関係から，その時の膜表面の物質濃度を求めることができる．

半透性膜の表面からどれ位離れた所までの物質濃度を反映しているのかは不明であるが，本論文で報告する結果から判断すると，ごく近傍，1 μm 以下の範囲である．すなわち，膜表面極近傍の濃度変化を非常に感度よく測定できる方法である．また，微少流量を測定する必要があるため細かい点に注意を払わなければならないが，測定装置にかかる費用は少なくて済むという特徴を持っている．しかし，実際の膜表面物質濃度を測定することができないため，透過速度から膜表面の物質濃度を較正できない．そのため，この方法では膜表面物質濃度の絶対値を求めることができず，その変化しかわからない．また，膜表面物質濃度に依存して透過速度が変わるメカニズムがはっきりしていないため，膜表面物質濃度の変化を推定する場合には注意深く検証する必要がある．

2.6.2. 顕微共焦点蛍光分光法(Confocal fluorescence microspectroscopy)

いわゆる共焦点レーザ蛍光顕微鏡の原理を用いて，非常に狭い領域の物質濃度を測定する方法である．図２-３は原理図であるが，二つのピンホールによって焦点外からの蛍光を弱めて受光し，焦点からの蛍光を主に測定する．全ての蛍光法に言えることであるが，励起光強度と蛍光物質の濃度に比例した数の蛍光分子が蛍光を発する．すなわち，励起光強度が一定の下では，測定体積中の蛍光物質の濃度に比例した蛍光強度が得られる．深さ分解能はピンホール径や対物レンズ，励起光波長により異なるが，直径 40 μm のピンホールと開口数 1.25 の 100 倍油浸対物レンズ，293 nm の励起波長を用いた場合に，ほぼ最高の深さ分解能である 0.5 μm が得られる．しかし，焦点距離が 1.5 mm 以上必要な本研究の場合には開口数が小さい低倍率の対物レンズしか使用できないため，深さ分解能はかなり大きくなると予想される．また，励起光のエネルギーが大きいほど，酸素濃度が高いほど多くの蛍光物質が蛍光を発しなくなってしまう（Photo bleaching）という問題がある．photo bleaching を少なく抑えるためには弱い励起光を用いたり，照射する時間をできるだけ少なくする必要がある（宝谷・木下）．

この方法は，現在市販されている共焦点レーザ蛍光顕微鏡を用いて実現できる．蛍光物質が分散している試料中では，測定部位が深くなるほど実際に蛍光分子に照射される励起光強度が減少してしまい，感度が低下してしまうため，補正が必要である (Masuhara and Sasaki, 1995).

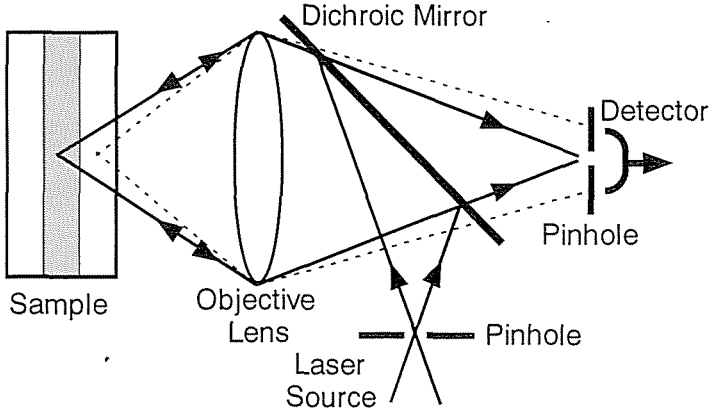

図２-３．顕微共焦点蛍光分光法の光学系
(from Masuhara and Sasaki, 1995)

2.6.3. 顕微共焦点吸光分光法(Absorption-mode confocal microspectroscopy)

測定原理は顕微共焦点蛍光分光法と似ているが，蛍光を発しない物質の濃度も測定できる．励起光により励起状態になった物質は，特定の波長の光を透過しにくくなるという性質を利用している．それ以外の特徴は顕微共焦点蛍光分光法と同じであるが，現在市販されている装置はない．

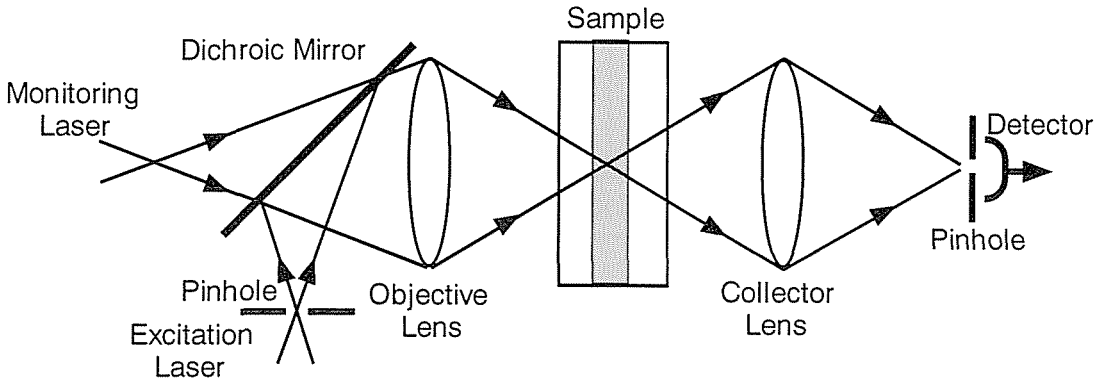

図2-4．顕微共焦点吸光分光法の光学系
(from Masuhara and Sasaki, 1995)

2.6.4. 光音分光法(Photoacoustic spectroscopy)

物質が光を吸収すると熱が生じる．強力なパルスレーザで急速に加熱すると媒質が膨張して，音を発する現象を利用している (Hsueh et al., 1990)．光を多く吸収する物質が均一に混ざった層とその物質がほとんどない層からなる試料にパルスレーザを照射すると，発生した熱がパルスレーザの1周期の間にどこまで拡散するかに応じて，発生する音の大きさと熱拡散距離との関係が変化する．熱が1周期内に吸収層内にしか拡散しない場合には，音の大きさは熱拡散距離の3乗に比例し，吸収物質がほとんどない層内にまで拡散する場合には2乗に比例する（図2-5）．これらの時の比例係数から熱を多く吸収する物質の濃度が求められ，比例関係が変化する時の熱拡散距離が吸収層の厚さとなる．しかし，吸収物質が均一ではないときには誤差が多くなってしまうことから本論文の目的には適さない．ちなみに，市販されている装置はない．

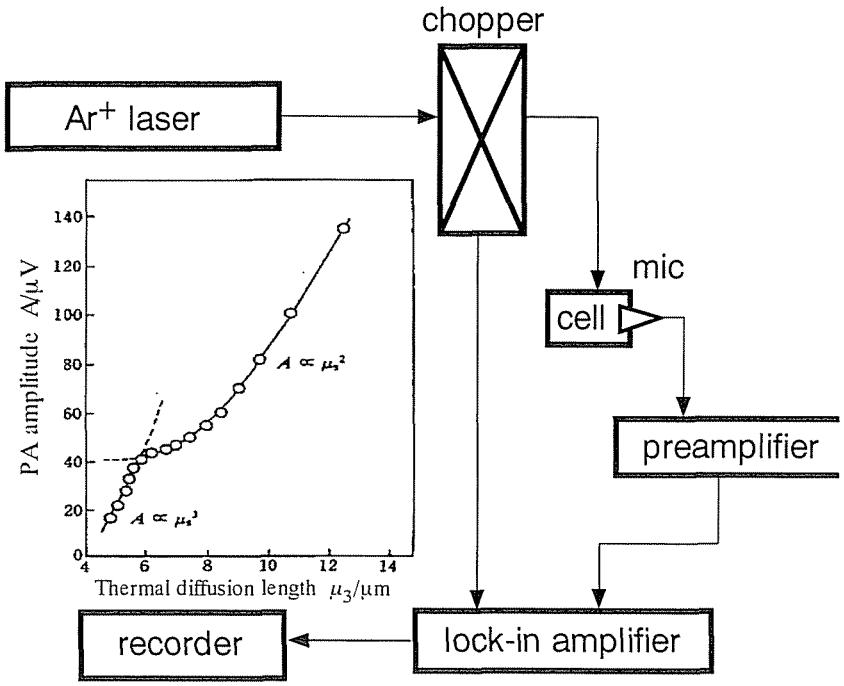

図２-５．光音分光測定装置のブロックダイアグラム
(from Hsueh et al., 1990)

2.6.5. 顕微熱レンズ分光法(Photothermal microscopy)

これも物質に光をあてた時にわずかに生じる熱によりその物質の周囲が膨張することを利用している (Harada et al., 1993; Morris and Peck, 1986). 膨張した部分がレンズのように働き，光を屈折させるため，その屈折量を測定することにより，光があたった部分の物質の濃度を知ることができる. ちょうど蜃気楼と同じ現象である．この原理を用いた 4 つの方法が提案されている．図２-６は，上から凹レンズのように使う方法，三角レンズのように使う方法，円筒レンズのように使う方法，格子状レンズのように使う方法である．この方法は，まだ基礎研究の段階であり，分解能も約 10 μm である.

現時点で，本研究で利用可能な方法は水透過速度測定法と顕微共焦点蛍光分光法であり，分解能の点で水透過速度測定法が最もよい．そこで，水透過速度測定法を用いるのが最も妥当であると考え，この方法における上述の問題点についてはいろいろな論点から注意深く検証することにした．また，第５章において，第３章で用いた灌流流路内における巨大分子濃度を直接測定する試みとして，共焦点法ではないが蛍光法により物質濃度を測定した.

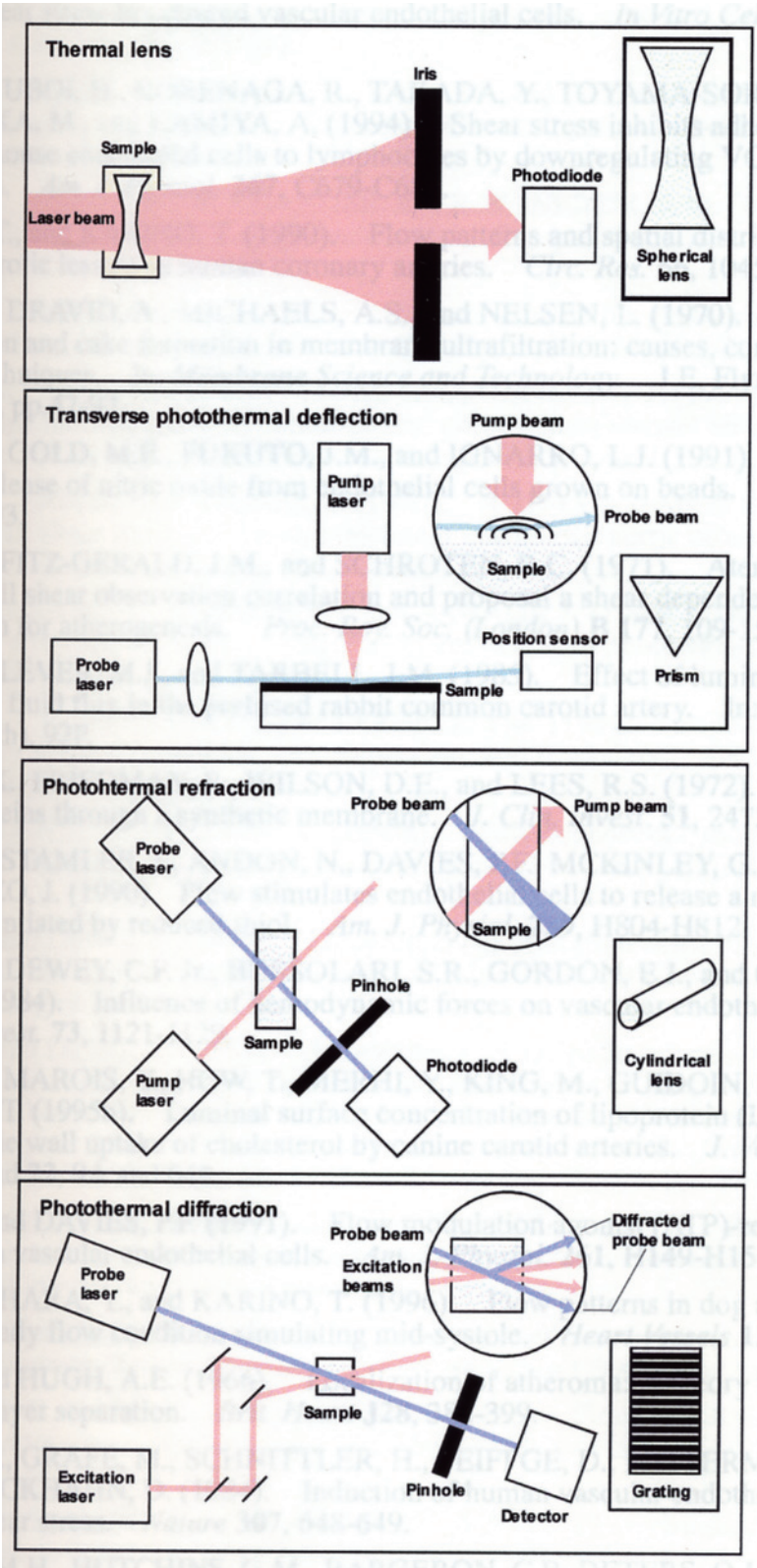

図２-６．光熱レンズ法を用いる４つの測定原理

(from Morris and Peck, 1986)

参考文献

ANDO, J., KOMATSUDA, T., and KAMIYA, A. (1988). Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress In cultured vascular endothelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* **24**, 871-877.

ANDO, J., TSUBOI, H., KORENAGA, R., TAKADA, Y., TOYAMA-SORIMACHI, N., MIYASAKA, M., and KAMIYA, A. (1994). Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *Am. J. Physiol.* **267**, C679-C687.

ASAKURA, T., and KARINO, T. (1990). Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ. Res.* **66**, 1045-1066.

BLATT, W.F., DRAVID, A., MICHAELS, A.S., and NELSEN, L. (1970). Solute polarization and cake formation in membrane ultrafiltration: causes, consequences, and control techniques. In: *Membrane Science and Technology.* J.E. Flynn Ed., Plenum, New York, pp.47-97.

BUGA, G.M., GOLD, M.E., FUKUTO, J.M., and IGNARRO, L.J. (1991). Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* **17**, 187-193.

CARO, C.G., FITZ-GERALD, J.M., and SCHROTEN, R.C. (1971). Ateroma and arterial wall shear observation correlation and proposal a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc. Roy. Soc. (London)* **B 177**, 109-159.

CARO, C.G., LEVER, M.J., and TARBELL, J.M. (1985). Effect of luminal flow rate on transmural fluid flux in the perfused rabbit common carotid artery. In: *Proc. Physiol. Soc.* (March), 92P.

COLTON, C.K., FRIEDMAN, S., WILSON, D.E., and LEES, R.S. (1972). Ultrafiltration of lipoproteins through a synthetic membrane. *J. Clin. Invest.* **51**, 2472-2481.

COOKE, J.P., STAMLER, J., ANDON, N., DAVIES, P.F., MCKINLEY, G., and LOSCALZO, J. (1990) Flow stimulates endothelial cells to release a nitrovasodilator that is potentiated by reduced thiol. *Am. J. Physiol.* **259**, H804-H812.

DAVIES, P.F., DEWEY, C.F. Jr., BUSSOLARI, S.R., GORDON, E.J., and GIMBRONE, M.A. Jr. (1984). Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. *J. Clin. Invest.* **73**, 1121-1129.

DENG, X.-Y., MAROIS, Y., HOW, T., MERHI, Y., KING, M., GUIDOIN, R., and KARINO, T. (1995b). Luminal surface concentration of lipoprotein (LDL) and its effect on the wall uptake of cholesterol by canine carotid arteries. *J. Vasc. Surg.* **21**, 135-145 and **22**, 9A and 648.

DULL, R.O. and DAVIES, P.F. (1991). Flow modulation agonist (ATP)-response (CA^{++}) coupling In vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **261**, H149-H154.

ENDO, S., SOHARA, Y., and KARINO, T. (1996). Flow patterns in dog aortic arch under a steady flow condition simulating mid-systole. *Heart Vessels* **11**, 180-191.

FOX, V.A., and HUGH, A.E. (1966). Localization of atheroma: A theory based on boundary layer separation. *Brit. Heart* **J28**, 388-399.

FRANKE, R.P., GRAFE, M., SCHNITTLER, H., SEIFFGE, D., MITTERMAYER, C., and DRENCKHAHN, D. (1984). Induction of human vascular endothelial stress fiber by fluid shear stress. *Nature* **307**, 648-649.

FRIEDMAN, M.H., HUTCHINS, G.M., BARGERON, C.B, DETERS, O.J., and MARK, F.F. (1981) Correlation between intimal thickness and fluid shear in human arteries. *Atherosclerosis* **39**, 425-436.

FRIEDMAN, M.H. , C.B, DETERS., BARGERON, O.J. , HUTCHINS, G.M, and MARK, F.F. (1981) Shear-dependent thickening of the human arterial intima. *Atherosclerosis* **60**, 161-171.

FRY, D.L. (1968). Acute vascular endothelial changes with increased blood velocity gradient. *Cerc. Res.* **22**, 165-197.

FRY, D.L., CORNHILL, F., SHARMA, H., PAP, J.M., and MITSCHELEN, J. (1986). Uptake of low density lipoprotein, albumin, and water by deendothelialized in vitro minipig aorta. *Arteriosclerosis* **6**, 475-490.

GEIGER, R.V., BERK, B.C., ALEXANDER, and R.W., NEREM, R.M. (1992). Flow-induced calcium transients in single endothelial cells: spatial and temporal analysis. *Am. J. Physiol.* **262**, C1411-C1417.

GUPTE, A. and FRANGOS, J.A. (1990). Effects of flow on the synthesis and release of fibronectin by endothelial cells. *In Vitro Cell Devel. Biol.* **26**, 57-60.

HARADA, M., IWAMOTO, K., KITAMORI, T., and SAWADA, T. (1993). Photothermal microscopy with excitation and probe beams coaxial under the microscope and its application to microparticle analysis. *Anal. Chem.* **65**, 1938-2940.

HAYASHI, K., YANAI, Y., and NAIKI, T. (1996). A 3D-LDA study of the relation between wall shear stress and intimal thickness in a human aortic bifurcation. *ASME J. of Biomechanical Engineering* **118**, 273-279.

HSUEH, Y., HARATA, A., KITAMORI, T. and SAWADA T. (1990). Depth profiling analysis of adsorbed species on a single microparticle with photoacoustic spectroscopy. *Analytical Sciences* **6**, 71-75.

JO, H., DULL, R.O., HOLLIS T.M., and TARBELL, J.M. (1991). Endothelial albumin permeability Is shear dependent, time dependent, and reversible. *Am. J. Physiol.* **260**, H1992-H1996.

KARINO, T., DENG, X., and NAIKI, T. (1995a). Flow-dependent concentration polarization of lipoproteins at the blood-endothelium boundary. *ASME BED* **29**, 13-14.

KARINO, T., and DENG, X. (1990). Lipoprotein concentration at the blood-endothelium boundary and its implications for the pathogenesis of vascular diseases. *J. Japanese College of Angiology* **30**: 710.

KARINO, T., and DENG, X. (1993). A hypothesis for the pathogenesis of atherosclerosis: Flow-dependent concentration polarization of lipoproteins at the blood-endothelium boundary. In: *Proc. Jikei University Medical School Symposium on Hemorheological Study on Microcirculatory Disturbances and Dysfunction of Vascular Endothelial Cells.* Y. ISOGAI Ed. Medical Review Inc., Tokyo: pp. 35-42.

KU, D.N., GIDDENS, D.P., ZARINS, C.K., and GLAGOV, S. (1985). Pulsatile flow and arteriosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low and oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* **5**, 293-302.

MASUHARA, H and SASAKI, K. (1995). Time-resolved fluorescence and absorption microspectroscopy of a single microparticle. *Analytica Chimica Acta* **299**, 309-318.

MATSUMOTO, T., NAIKI, T., and HAYASHI, K. (1992). Flow visualization analysis in a model of artery-graft anastomosis. *Bio-Medical Materials and Engineering* **2**, 171-183.

MATSUMOTO, T., NAIKI, T., and HAYASHI, K. (1994). Flow visualization analysis of pulsatile flow in elastic straight tubes. *Biorheology* **31**, 365-381.

MO, M., ESKIN, SG., and SCHILLING, WP. (1991). Flow-induced changes in Ca^{2+} signaling of vascular endothelial cells: effect of shear stress and ATP. *Am. J. Physiol.* **260**, H1698-H1707.

MORRIS, M.D. and PECK, K. (1986). Photothermal effects in chemical analysis. *Analytical Chemistry* **58**, 811A-822A.

MOTOMIYA, M. and KARINO, T. (1984). Flow patterns in the human carotid artery bifurcation. *Stroke* **15**, 50-56.

NAIKI, T., HAYASHI, K., and TAKEMURA, S. (1995). A LDA and flow visualization study of pulsatile flow in an aortic bifurcation model. *Biorheology* **32**, 43-59.

NEREM, R.M., LEVESQUE, M.J., and CORNHILL, J.F. (1981). Vascular endothelial morphology as an Indicator of the pattern of blood flow. *ASME J. Biomech. Eng.* **103**, 172-176.

NOLLERT, M.U., ESKIN, S.G., and MCINTIRE, L.V. (1991). Hydrodynamic shear stress and mass transport modulatin of endothelial cell metabolism. *Biotehnol. Bioeng.* **38**, 588-602.

OOKAWA, K., SATO, M., and OHSHIMA, N. (1993). Morphological changes of endothelial cells after exposure to fluid-Imposed shear stress: differential responses Induced by extracellular matrices. *Biorheology* **30**, 131-140.

ROSS, R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis –an update. *New Engl. J. Med.* **314**, 488-500.

SATO, M. and OHSHIMA, N. (1994). Flow-Induced changes In shape and cytoskeletal structure of vascular endothelial cells. Biorheology 31, 143-153.

SHEN, J., LUSCINSKAS, F.W., CONNOLLY, A., DEWEY, C.F., JR., and GIMBRONE, M.A., JR. (1992). Fluid shear stress modulates cytosolic free calcium in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol.* **262**, C384-C390.

SILL, H.W., CHANG, Y.S., ARTMAN, J.R., FRANGOS, J.A., HOLLIS, T.M., and TARBELL, J.M. (1995). Shear stress Increases hydraulic conductivity of cultured endothelial monolayers. *Am. J. Physiol.* **268**, H535-H543.

SPAIN, D.M. (1966). Atherosclerosis. *Scientific American* **215** 48-56.

SPRAGUE, E.A., STEINBACH, B.L., NEREM R.M., and SCHWARTZ, C.J. (1987). Influence of a laminar steady-state fluid-Imposed wall shear stress on the binding, Internalizaiton, and degradation of low-density lipoproteins by cultured arterial endothelium. *Circulation* **76**, 648-656.

TEXON, M., IMPARATO, A.M., and LORD, J.W. (1960). The hemodynamic concept of Atherosclerosis. *Arch. Surg.* **80**, 47-53.

WADA, S., and KARINO, T. (1999). Theoretical study on flow-dependent concentration polarization of low density lipoproteins at the luminal surface of a straight artery. *Biorheology* **36**, 207-223.

WECHEZAK, A.R., VIGGERS, R.F., and SAUVAGE, L.R. (1985). Fibronectin and F-Actin redistribution In cultured endothelial cells exposed to shear stress. *Lab. Invest.* **53**, 639-647.

WECHEZAK, A.R., WIGHT, T.N., VIGGERS, R.F., and SAUVAGE, L.R. (1989). Endothelial adherence under shear stress is dependent upon microfilament reorganization. *J. Cell. Physiol.* **139**, 136-46.

WESOLOWSKI, S.A., FRIES, C.C., SABINI, A.M., and SAWYER, P.N. (1965). The significance of turbulence inhemic systems and in the distribution of the atherosclerotic lesion. *Surgery* **57** , 155-162.

YOSHIZUMI, M., KURIHARA, H., SUGIYAMA, T., TAKAKU, F., YANAGISAWA, M., MASAKI, T., and YAZAKI, Y. (1989). Hemodynamic shear stress stimulates endothelin production by cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **161**, 859-864.

佐藤正明 (1996). 動物細胞の形態・機能と力学的刺激に対する応答について. *第7回バイオエンジニアリング学術講演会・夏季セミナー講演論文集* **no.96-29**, 7-14.

内貴 猛, 松本健郎, 林紘三郎 (1990) 人工血管・生体血管吻合部におけるコンプライアンスミスマッチの流れに対する影響. *人工臓器* **19**, 1306-1309.

内貴 猛, 箭内 豊, 林紘三郎 (1995) 血液モデルとしての高分子溶液の評価（血流モデル実験のための基礎研究）. *日本バイオレオロジー学会誌* **9**, 84-89.

内貴 猛, 竹村真一, 林紘三郎 (1994). 大動脈分岐部拍動流に及ぼす血管弾性の影響（モデル管内流れの可視化による検討）. *日本機械学会論文集B編* **60**, 3623-3629.

内貴猛 (1990). 動脈流モデルとしての弾性管内拍動流の可視化観察. 修士論文, 北海道大学工学研究科生体工学専攻.

宝谷・木下編, 立体断面を見る（共焦点レーザー走査蛍光顕微鏡）, In 「*限界を超える生物顕微鏡*」第4章, 学会出版センター.

山本章編 (1994). 動脈硬化, In 「からだの科学」第178号, 日本評論社, p 13.

第3章 水透過速度測定による培養血管内皮細胞単層表面上における巨大分子の流速依存性濃縮現象の解析

3.1. 緒言

動脈硬化症は，動脈分岐部や彎曲部のように血流が乱れて二次流れや渦が発生しやすい部位に好発する(Schwartz and Mitchell, 1962; Spain, 1966; Caro et al., 1971)．このことは，動脈硬化症の発症や進展，衰退には，血液の流れが重要な役割を果たしている可能性を示している．血流と動脈硬化症の局在化の関係を明らかにするために，本研究を含む多くの研究がこれまでなされてきた(Ku et al., 1985: Asakura and Karino, 1990; Friedman et al., 1991; Naiki et al., 1995; Hayashi et al., 1996)．これらの研究の結果，動脈硬化病変は，ほぼ間違いなく壁せん断応力の低い場所で起こることが明らかになった．しかし，どのようなメカニズムで血液の局所的な流れが動脈硬化病変の発生や進展，衰退を制御しているのかは，まだよくわかっていない．

初期の動脈硬化病変に関する病理学的研究から，血管内膜へのコレステロールの蓄積が病変発症の引金になっていることがわかっている(Dayton and Hashimoto, 1970; Ross, 1986)．コレステロールは血中のリポ蛋白，特に低密度リポ蛋白（LDL）によって供給される．また，実際に実験用動物に高コレステロール食を与えた場合に動脈硬化病変が発症する部位の血管壁では，正常食を与えて病変がない場合でも，LDL の取り込み速度や分解速度，濃度がほかの部位よりも高いことがわかっている(Duncan et al., 1963; Schwenke and Carew, 1988; Berceli et al., 1990)．さらに，Smith and Staples (1980)は，ヒト大動脈内膜内の LDL 濃度がそのヒトの血漿内濃度のほぼ２倍になっていると報告している．これらの結果は，動脈内の特に動脈硬化病変が発症しやすい低壁せん断速度部位において，血液と血管内皮の境界での LDL の濃度が血管中心部における濃度より高くなっている可能性を示唆している．動脈壁は血漿内の水分を通しやすいが血漿蛋白やリポ蛋白のような巨大分子を通しにくいため，これらの巨大分子に対して動脈壁は分子ふるいとして振る舞うことを考えると，血液と血管内皮の境界での LDL の濃度が高くなることが予測される．こ

の考えはColton et al. (1972)により初めて示され，リポ蛋白の濃度分極(concentration polarization of lipoproteins)と呼ばれている．血液と血管内皮の境界でのLDLの濃縮度合いは，Colton et al.が示したように血管壁における水分の透過速度によって決まるだけではなく，図２-２に示したように主流方向の血流速度にも依存していると考えられる．すなわち，血管内皮表面上でのリポ蛋白濃度は，その部位における局所血流速度，動脈入り口からの距離，血圧に依存する血管壁における水透過速度，および血液中におけるリポ蛋白分子の拡散速度によって決定されていると考えられる．

壁面における血漿蛋白の濃度におよぼす水透過速度や灌流流速の影響に関しては，透析技術の開発段階において多くの研究がなされている(Blatt et al, 1970)．しかし，その考えを動脈に当てはめ，動脈内の条件でもその現象が起こり，動脈硬化病変の局在的な発症に関与していると考えられるようになったのは，ごく最近になってからである．この現象に関してKarino and Deng (1990, 1993, 1995a)，Deng et al. (1995b)，Wada and Karino (1999) は，数値計算によりリポ蛋白の血管内皮表面における濃度におよぼす灌流速度と血管壁における水透過速度の影響について検討を行った．その結果，リポ蛋白の表面濃度は灌流のないときに最も高く，灌流速度を増すほど低下することが明らかになった．これは，灌流により血管入り口から下流へ向かって高くなるような表面濃度の分布が生じ，十分に発達するまでの距離が灌流速度に依存するためである．さらに，巨大分子の表面濃度はその分子の拡散係数に依存し，拡散係数の小さい大きな分子ほど高い濃度になることが示された．この現象は，上記の研究者らにより巨大分子の流速依存性濃縮現象と呼ばれている．

本章の研究は，この巨大分子の流速依存性濃縮現象が血液と血管内皮の境界で起こることを実験的に証明するために行った一連の研究の最初のものであり，血管壁のモデルとして培養血管内皮細胞単層を用い，その内腔表面における血漿蛋白とリポ蛋白の濃度におよぼす定常せん断流れの影響を調べた研究である．なお，本研究では，先に ２.６.１ で述べた一定差圧の状態での水透過速度の変化を調べる方法により，巨大分子の表面濃度を推定した．

3.2. 試料および方法

3.2.1. 血管内皮細胞の培養

血管内皮細胞は，屠殺場で入手したウシ胸部大動脈から Jaffe(1984)の方法によりコラゲナーゼ(C-5138, Sigma Chemicals, St. Louis, Mo.)を用いて採取した．ウシ胎児血清を 20 %の体積割合で含み，50 U/mℓのペニシリン，50 μg/mℓのストレプトマイシン，2.5 μg/mℓのアムポテリシン B，16.2 U/mℓのナトリウム・ヘパリンを含んだイスコフ改変ダルベッコ溶液(I-7633, Sigma Chemicals)を細胞培養液として用い，血管内皮細胞を 5 % CO_2 インキュベータ中で一般的な方法で培養した．２～３日おきに細胞培養液を交換した．細胞がコンフリューエントになる直前に，0.5 g/ℓのトリプシンと 0.2 g/ℓの EDTA を混入したハンクス緩衝塩溶液(HBSS, H-2387, Sigma Chemicals)を用いた標準的な細胞剥離法で，１：４の分割比で継代培養した．大動脈から採取した細胞が血管内皮細胞であることは，敷石状の形状で単層を形成していること，および蛍光顕微鏡観察の結果 1, 1' - dioctadecyl - 3, 3, 3', 3' - tetramethyl indocarbocyanine perchlorate で蛍光標識したアセチル化低密度リポ蛋白 (DiI-Ac-LDL, Molecular Probes, Eugene, Ore.)の取り込み能が高いことによって同定した．

3.2.2. 培養血管内皮細胞単層の作製

ウシ胸部大動脈より採取した血管内皮細胞を透過性のある多孔質膜に播種・培養し，それを水透過性のある血管内皮のモデルとして灌流実験に使用した．多孔質膜には透明で蛋白吸着性が低く，直径 0.4 μm の細孔を有する親水性 PTFE (Polytetrafluoroethylene) の膜を用いた．実際には，この多孔質膜を底面に貼り付けてある Millicell-CM culture insert (PICM 03050; Millipore Corp., Bedford, Mass., 有効透過面積 4.2 cm^2)を用い，その底面の外側に血管内皮細胞を播種・培養した．このミリセル・カルチュア・インサートは本来，多孔質膜の内側に細胞を播種して使うものであるが，本研究では播種方法を工夫して膜の外側に播種した．また，このインサートの底面の膜がない端の部分には高さ 1 mm の突起がついているが，実験では隙間 0.5 mm の平行平板型流路にこのインサートを装着するため，あらかじめこの突起を高さ 0.5 mm になるように，紙やすりですり落とした．この操作は，滅菌

した紙やすりと高さ測定用の厚さ 0.5 mm のシリコン・シートを用い，クリーンベンチの中で行った．インサートの底面を上に向け，多孔質膜の表面に 0.1 %ファイブロネクチン水溶液(F-1141, Sigma Chemicals)を 0.4 mℓ垂らし，メスピペットチップの先で，多孔質膜表面に塗り拡げた．37° C のインキューベータ内に 2 時間静置後，多孔質膜表面上の溶液を取り除き，ファイブロネクチンが吸着した多孔質膜をクリーンベンチ内で乾燥させた．6～20 代目の内皮細胞を 5 $\times 10^6$ 個含んだ細胞培養液 0.5 mℓを多孔質膜の上に載せ，一様に膜を覆った．約 3 時間インキュベータ内に静置して細胞を多孔質膜上に播種した．その後，インサートをひっくり返して本来の状態に戻し，培養ウェル内の細胞培養液に浸した．細胞の培養については，３.２.１ に記したディッシュにおける培養方法と同じ方法で行った．図３-１はこのようにして培養した血管内皮細胞の写真である．培養中の細胞の状態や密度は倒立型位相差顕微鏡(Diaphot TMD300, Nikon)と膜抵抗計(Millicell-ERS, Millipore Corp.)を用いて調べた．膜抵抗計は内皮細胞単層両面間の電位差や電気抵抗を測定することができ，細胞単層の状態と細胞の密度を定量的に測定できる．経験から電気抵抗が 20 Ω (= 84 Ωcm^2)以上のインサートはその多孔質膜が完全に内皮細胞で覆われた状態（図３-１）であり，このような状態の内皮細胞単層のみを実験に使用した．

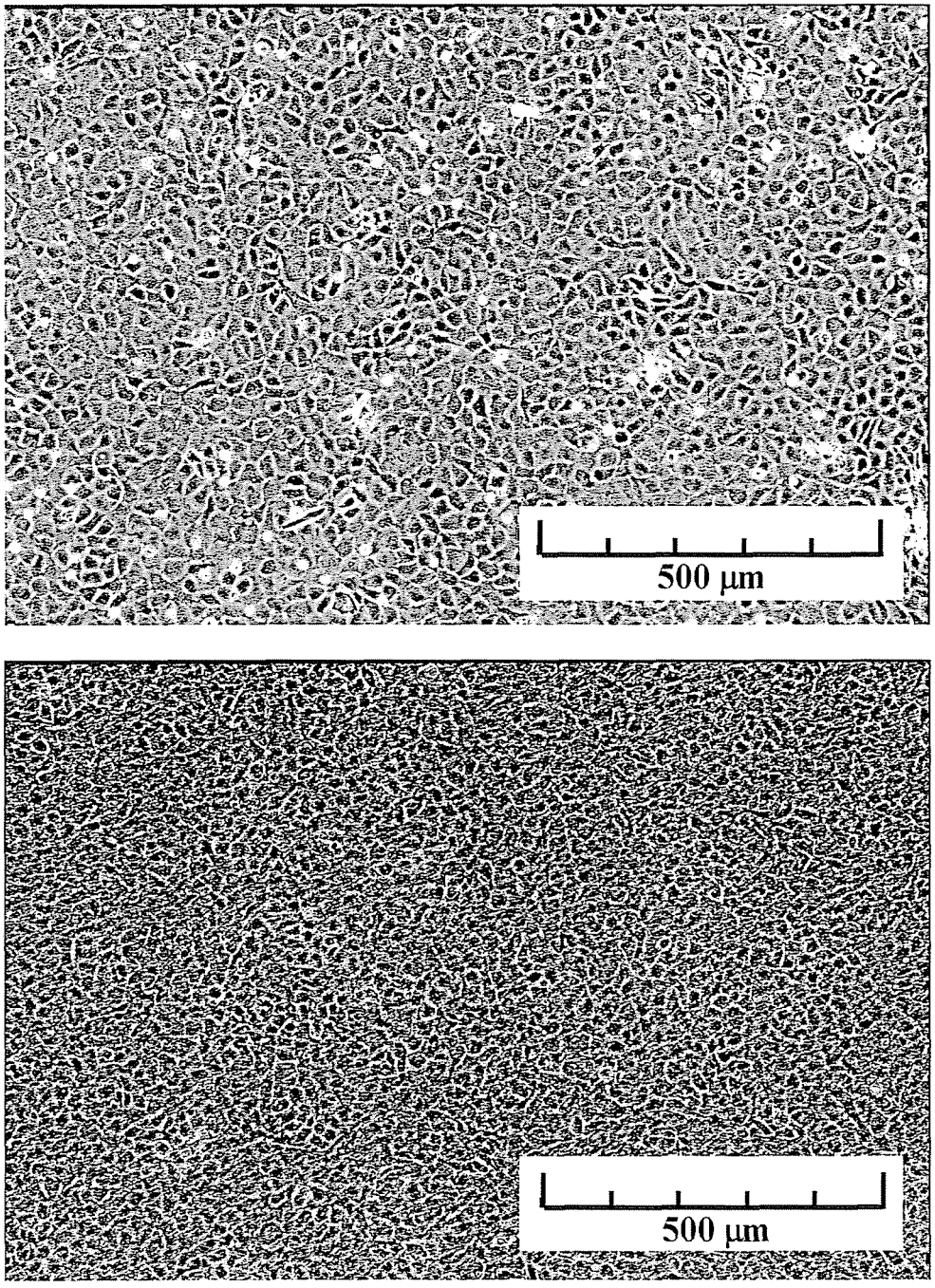

図３-１．実験に使用した血管内皮細胞単層の写真

The upper figure is a photograph of the monolayer of bovine aortic endothelial cells cultured on a cell culture dish and the lower one on a Millipore filter. Since Millipore filter is not perfectly transparent, it is difficult to see cell morphology clearly.

3.2.3. 水透過速度測定装置および灌流装置

図３-２は使用した灌流装置の模式図である．この装置は上流側ボトル，平行平板型流路，下流側ボトル，遠心ポンプから成っている．それらの構成要素を接続するのに，タイゴン・チューブを使用した．平行平板型流路の上側のアクリル板に，血管内皮細胞を播種したインサートを細胞単層面が流路の一部になるように装着した．平行平板型流路の隙間は 0.5 mm，幅は 40 mm であり，流路入り口から 94 mm 下流にこのインサートを装着した．したがって，本研究で設定した最も高い流量である 200 mℓ/min においても，内皮細胞単層上の流れは十分に発達した層流（ポアズイユ流れ）になっていることになる．インサートの内側には，シリンジ・フィルタの膜支持部を加工した部品を入れ，灌流圧を加えた状態でも内皮細胞を播種した多孔質膜がたわまないようにした．また，インサートの内側には，灌流液と同じ液を入れた．平行平板型流路の上流と下流に取り付けたボトルによって，遠心ポンプによる拍動性を取り除き，平行平板型流路内の流れを安定させた．上流側ボトル内の灌流液には，95 %の空気と 5 %の二酸化炭素の混合ガスをバブリングし，灌流液の pH を 7.4 位に保った．灌流流量と平行平板型流路内の細胞単層中心近くの灌流圧を，ギア式流量計(DU-5TGS-1FV, Stec, Tokyo)および圧力トランスデュサ(AB/HP-6psiG, Data Instruments, Acton, Mass.)で測定した．灌流液中の血清濃度が細胞単層における水透過速度に与える影響を調べる実験では，灌流液を循環する必要はないので，ヘッドタンクのみを使用した．遠心ポンプを除く灌流装置のほとんどの部分を恒温槽内の水中に沈め，細胞培養と同じ 37° C の温度に保った．温度を一定にする理由はもうひとつあり，正確な水透過速度の値を測定するためである．実験にはあらかじめ蛋白除去洗剤等を用いてきれいに洗い，滅菌した灌流装置を用いた．

平行平板型流路の上部に取り付けたメスピペットは，インサートの内部に通じており，細胞単層における水透過速度を測定するのに用いた．また，そのメスピペットの下端近くに内径 1 mm 位のタイゴン・チューブを装着し，一回の測定が終わるごとにそのチューブから液を流し出し，メスピペット内の液面をはじめの位置へ戻すのに用いた．図３-３は装置全体の外観の写真である．

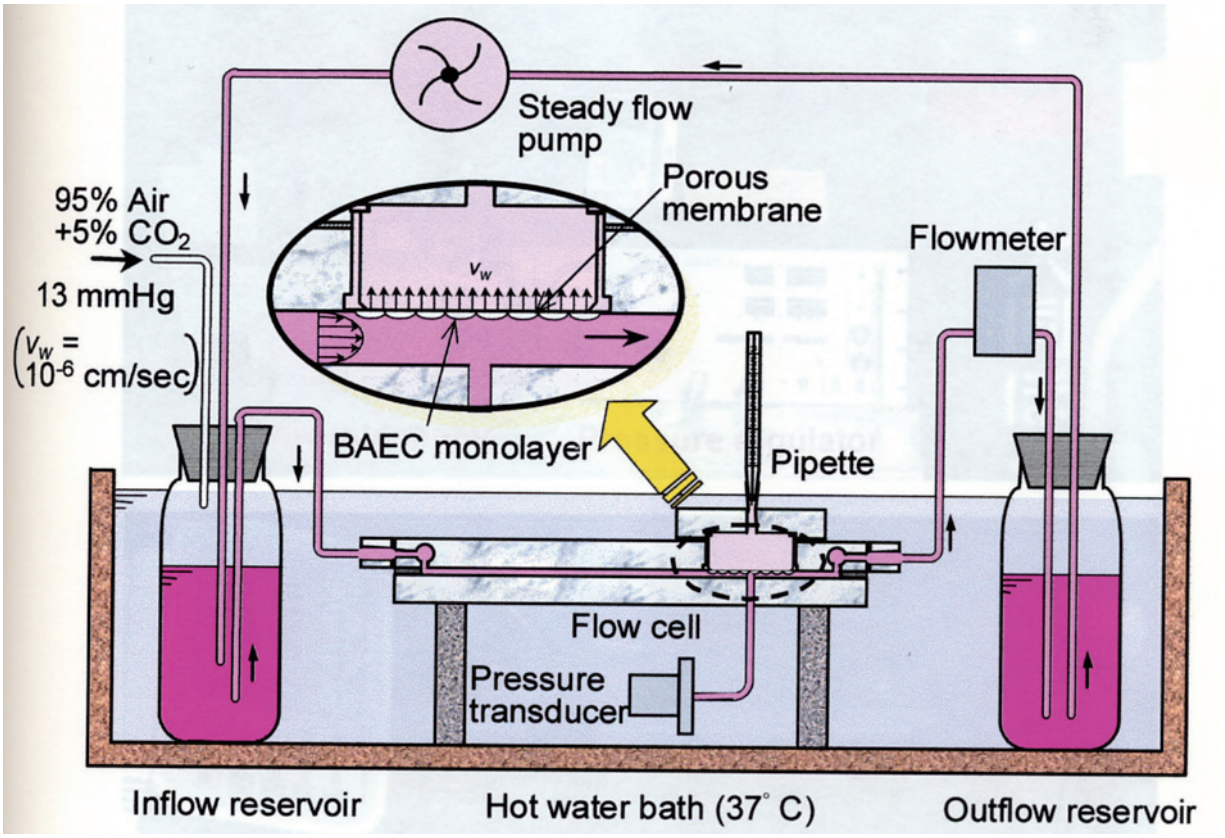

図３-２．灌流装置の模式図

BAECs were cultured in a monolayer on a porous membrane, and installed in an Plexiglass parallel plate flow cell having a height of 0.5 mm. The apparent concentration of serum on the surface of a BAEC monolayer (apparent surface concentration) was estimated from the water filtration velocity measured with a graduated pipette.

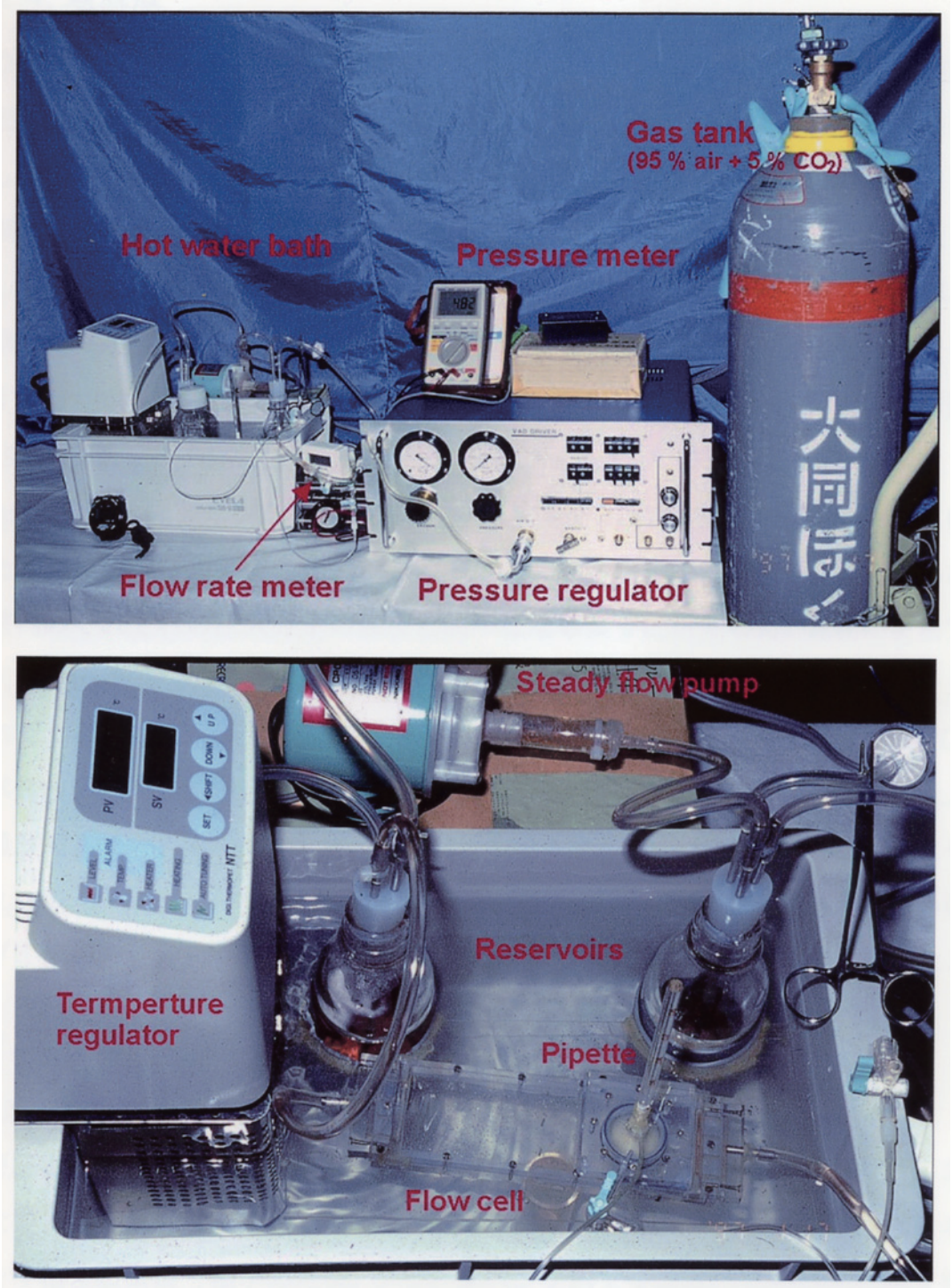

図３-３．実験装置の外観写真

LVAD (Left Ventricle Assist Devise) driver was used to control gas pressure.

3.2.4. 灌流液

ウシ胎児血清(Filtron Pty. Ltd., Brooklyn, Australia)と細胞培養時に使用した培養液と同じ抗生物質を含んだ細胞培養液(RPMI 1640; R-6504, Sigma Chemicals)を灌流液として使用した. 細胞単層における水透過速度に与える灌流液中の血清濃度の影響を調べる実験では, 体積濃度で 0, 2, 5, 10, 20, 40, 100 %の血清を含んだ灌流液を作製し, 使用した. また, 水透過速度に与える灌流速度の影響を調べる実験では, 体積濃度で 0, 20, 40, 100 %の血清を含んだ灌流液を使用した. さらに, 灌流液中に存在する2つの巨大分子の影響を調べるため, 174.8 mg/dℓのウシ血漿由来リポ蛋白(89.9 % HDL and 9.4 % LDL; L-3626, Sigma Chemicals)だけを含んだ灌流液と, 940 mg/dℓのウシ由来アルブミン(A-7284, Sigma Chemicals)だけを含んだ灌流液を使用した. これらの巨大分子の灌流液中の濃度は, 体積濃度で 20 %の血清を含んだ灌流液内のそれぞれの巨大分子の濃度と同一になるように調整した. 実験に使用する全ての灌流液について, 実験開始前にあらかじめ約 24 時間 CO_2 インキュベータに入れておき, pH を 7.4 に, 温度を 37° C にした. 各灌流液の粘性係数については, ウベローデ型毛細管粘度計を用い, 水透過実験と同じ 37° C の温度で測定した. 体積濃度で 0, 2, 5, 10, 20, 40, 100 %の血清を含んだ灌流液の粘性係数は, それぞれ 0.72, 0.72, 0.72, 0.73, 0.75, 0.77, 0.95 cP であった. また, リポ蛋白のみ, あるいはアルブミンのみを含んだ灌流液の粘性係数は, それぞれ 0.72 と 0.71 cP であった.

3.2.5. 実験手順および解析

(a) 灌流液中の血清濃度の影響を調べる実験

細胞単層における水透過速度に与える灌流液中の血清濃度の影響を調べる実験は次のようにして行った. ミリセル·カルチュア・インサートに播種した細胞の状態を位相差顕微鏡で確かめた後, クリーンベンチ内でインサートの内側に膜支持部品を入れ, インサートを平行平板型流路上部壁の丸穴へ静かに挿入した. 平行平板型流路を組み立て, その中に灌流液を満たし, 流路についている全てのポートを塞いだ. その後, インサートの内側に灌流液と同じ液を満たした. 平行平板型流路の入り口に灌流液で満たしたヘッドタンクをタイゴン·チューブで接続し, 恒温水槽

内に装置を沈めた．細胞単層の両面間の差圧をなくし，装置全体が一定温度になるまで約１時間静置した．その後，ヘッドタンクを持ち上げ，灌流圧を上昇させ，細胞単層を含む膜の両面に負荷されている圧力の差（差圧）を 10 mmHg に設定し，生体内における動脈と同じ水透過速度で水透過を開始させた．灌流圧はヘッドタンクの高さを調節することにより制御した．水透過を開始してから 1 時間は，10 分おきに一定体積(V_m)の液が透過するのにかかる時間(t_m)をメスピペットとストップ･ウォッチを用いて計測した．そして，設定した体積 V_m を計測した時間 t_m と多孔質膜の有効表面積 S で割ることにより細胞単層を透過した液の透過速度 v_w を算出した．計測は数回繰り返し行い，その平均値を求めた．一回の計測を終えるたびにメスピペット内の液体を流し出し，測定の開始時におけるメスピペット内の液面の高さを常に一定にした．また，次の計測までの間にも，メスピペット内の液面の高さを一定に保った．透過を開始してから 60 分後の計測が終了した後，灌流圧を元に戻し，平行平板型流路を分解することなく灌流液を入れ替えた．そして上に述べた方法でその灌流液について測定した．

全ての灌流液について水透過速度を測定した後，平行平板型流路からインサートを注意深く取り出し，細胞単層の状態を位相差顕微鏡で観察した．細胞単層の状態が実験開始前と比べて変わってしまった場合には，その細胞を使って得たデータを全て破棄した．

(b) 灌流速度の影響を調べる実験

細胞単層における水透過速度に与える灌流速度の影響を調べる実験は，以下の手順で行った．上流側と下流側の両方のボトルに 70～100 mℓの灌流液を満たし，平行平板型流路の代わりにチューブコネクタを用い，平行平板型流路を除く全ての部品を組み立て，全てのポートを塞ぎ，恒温水槽内に沈めた．その後，接続チューブや遠心ポンプなどの灌流部分に上流側と下流側のボトル内に入れておいた灌流液を満たし，平行平板型流路を接続する前にしばらく灌流し，流路内の気泡を取り除いた．数分後，細胞を播種したインサートを前述のように平行平板型流路に取り付け，それをさらに灌流装置に取り付けた．

約１時間後，上流側ボトルへ供給している混合ガスの圧力を調節して，細胞単層を含む膜の両面に負荷されている圧力の差（差圧）を 10 mmHg に設定し，水透過を開始した．水透過開始から 10, 20, 30, 40, 50, 60 分後に，細胞単層における水透過速度を前述のようにして測定した．そして，透過開始から 65 分後に遠心ポンプを作動して灌流を開始した．細胞単層の中心付近の差圧を一定に保ったまま，灌流流量を 50 mℓ/min に設定し，水透過速度の測定を続けた．この際，ピンチコックでチューブを締め付ける度合いを調整したり，遠心ポンプの回転数を調整して灌流流量を制御した．灌流流量(Q)については，0 mℓ/min から初めて，透過開始から 65, 95, 125, 155, 185, 215 分後にそれぞれ 50, 100, 150, 100, 50, 0 mℓ/min に段階的に変化させた．灌流流量を 0, 50, 100, 150 mℓ/min にすることにより，細胞単層表面でのせん断速度($\dot{\gamma}_w$)はそれぞれ 0, 500, 1000, 1500 sec^{-1} になる．はじめの灌流流量($\dot{\gamma}_w = 0$ sec^{-1})を除いて，それぞれの灌流流量については 30 分間維持した．この実験の場合には，先ほどの血清濃度の影響を調べる場合と異なり，灌流液ごとに細胞単層を交換した．血清やリポ蛋白，アルブミンを含まない灌流液を使用した場合には，細胞がはがれやすいため，0 と 150 mℓ/min の流量条件のみで実験を行い，実験時間を短くして，細胞がはがれるのを防いだ．

実験終了後，差圧を 0 mmHg に戻し，インサートを注意深く取り出し，細胞の状態を位相差顕微鏡で観察し，細胞がはがれていた場合には，そのデータを破棄した．

全ての実験は，同じ条件，手順で，別の新たな細胞単層を用いて，３回以上行った．その結果は，平均値と標準偏差で表した．２つの平均値間の有意差検定は，両端 t 検定により行った．

3.3. 実験結果

3.3.1. 水透過速度におよぼす灌流液中巨大分子濃度の影響

図３-４は，流れのない状態で 10 mmHg の加圧下で測定した灌流液（RPMI 1640）中の血清濃度と加圧してから 60 分後における水透過速度との関係を示している．

図中には，灌流液中のリポ蛋白濃度も同時に載せてある．ミリセル・カルチャ・インサートの内外にはまったく同じ液を入れてあり，水透過をはじめる前には細胞単層両面間にいかなる物質の濃度勾配も存在しないにもかかわらず，実験の結果から細胞単層を透過する水分の透過速度が灌流液中の血清濃度に依存して変化することがわかった．水透過速度は血清が入っていないときと比べて，ほんの少しの血清を灌流液に混入しただけでも大きく減少した．そして，灌流液中の血清濃度が 20 % を越えると，血清濃度を増やしたときに水透過速度はほぼ直線的に減少し，その減少率は血清濃度が低いときに比べて小さくなった．この結果は別の細胞単層を使った場合でもほぼ同じで，標本によるばらつきは少なかった．データ間をスプライン補完し，以降の実験において測定した水透過速度から細胞単層表面上における見かけ上の血清濃度とリポ蛋白濃度を推定するための較正曲線として用いた．

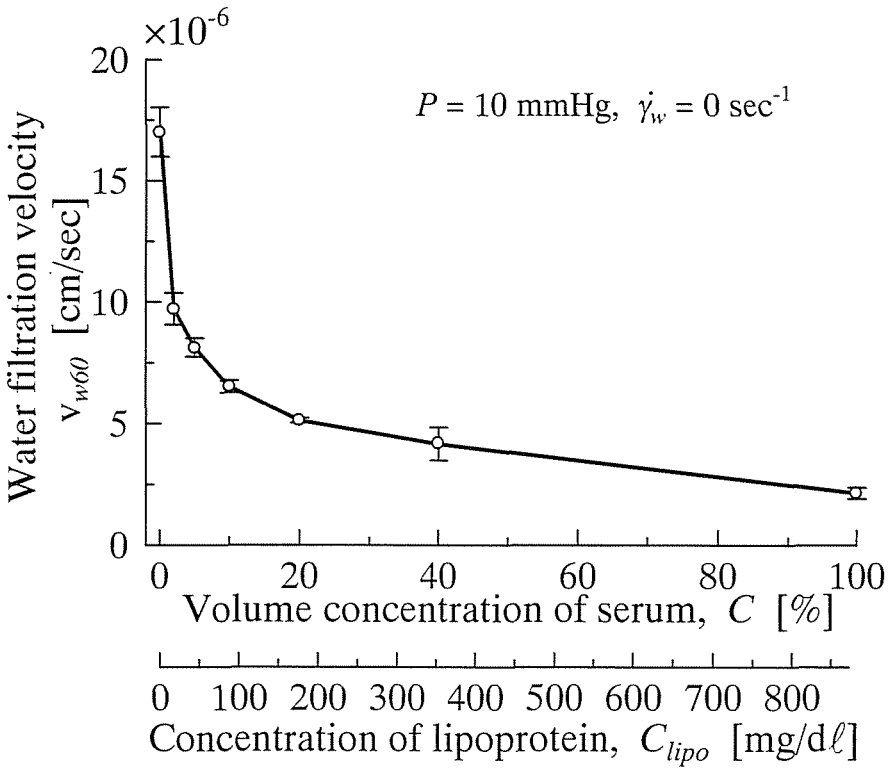

図３-４．水透過速度におよぼす灌流液中の血清濃度の影響

This relation was used to estimate the apparent surface concentration of lipoproteins from a water filtration velocity obtained under a constant transmural pressure. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 8 at serum concentrations of 0, 20, and 100 %, n = 3 at serum concentrations of 2, 5, and 10 %, and n = 6 at 40 %.

3.3.2. 水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響

図３-５，図３-６，図３-７は，それぞれ体積濃度で０％, 20 %, 100 %の血清を含んだ灌流液を使用した場合の水透過速度の経時変化を示している．それぞれの図で，上部のＡは水透過速度の実測値を示した図であり，下部のＢはそれを実験開始より 60 分後の値で正規化して，灌流流量 0 mℓ/min の時の水透過速度からの変化率として整理した図である．図中の縦破線は，灌流速度を変化させた時点を示している．灌流液中に巨大分子がまったく入っていない場合には，図３-５のように灌流速度を変化させても水透過速度はまったく変化しなかった．ところが，巨大分子を含んでいる灌流液では，図３-６，図３-７に示したように，灌流速度の変化に応じて水透過速度が変化した．この灌流速度に応じた水透過速度の変化は５分でほぼ終了した．そして，灌流速度を増大すると水透過速度も増大し，灌流速度を減少すると水透過速度も減少した．そしてその変化には再現性があった．また，これらの図から，灌流した場合にも灌流しないとき（図３-４）と同じように，灌流液中の血清濃度，従ってリポ蛋白の濃度が高いほど水透過速度が小さくなることがわかった．

図３-８は，４種類の血清濃度の異なる灌流液における灌流速度と水透過速度との関係を示している．この図から，水透過速度の実測値および正規化した値におよぼす灌流速度の影響は，20 %の血清を含んだ灌流液で最も大きく，血清を含まない灌流液を除けば，血清のみを使用した灌流液で最も小さいことがわかる．壁せん断速度と正規化した水透過速度の平均値との間の相関係数は，0, 20, 40, 100 %の血清を含んだ灌流液において，それぞれ 0.280, 0.969, 0.971, 0.928 であった．40%あるいは 100 %の血清を含んだ灌流液での水透過速度の灌流速度に対する変化は，20 %の血清を含んだ灌流液に比べて小さいが，両者の間に強い相関関係があることをこれらの数値は示している．

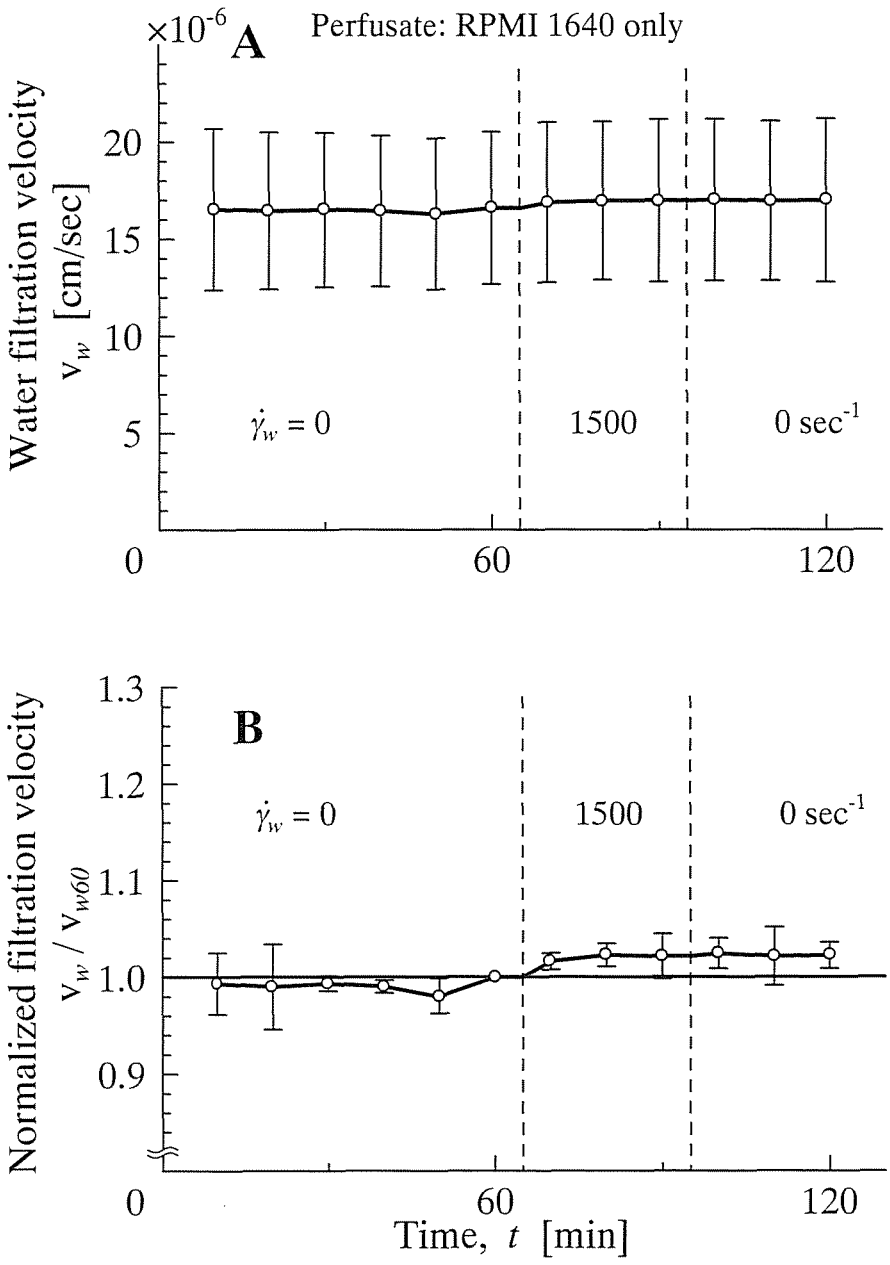

図３-５．血清を含まない灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響

Time-dependent variations of water filtration velocities (A) and filtration velocities normalized by the values obtained 60 minutes after starting the flow experiment (B). Measurements were carried out with a pure cell culture medium which contained no macromolecule. Flow rate was changed 65 and 95 minutes after starting the flow experiment. Wall shear stress calculated for shear rate of 1500 sec^{-1} was 10.7 $dynes/cm^2$. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 5.

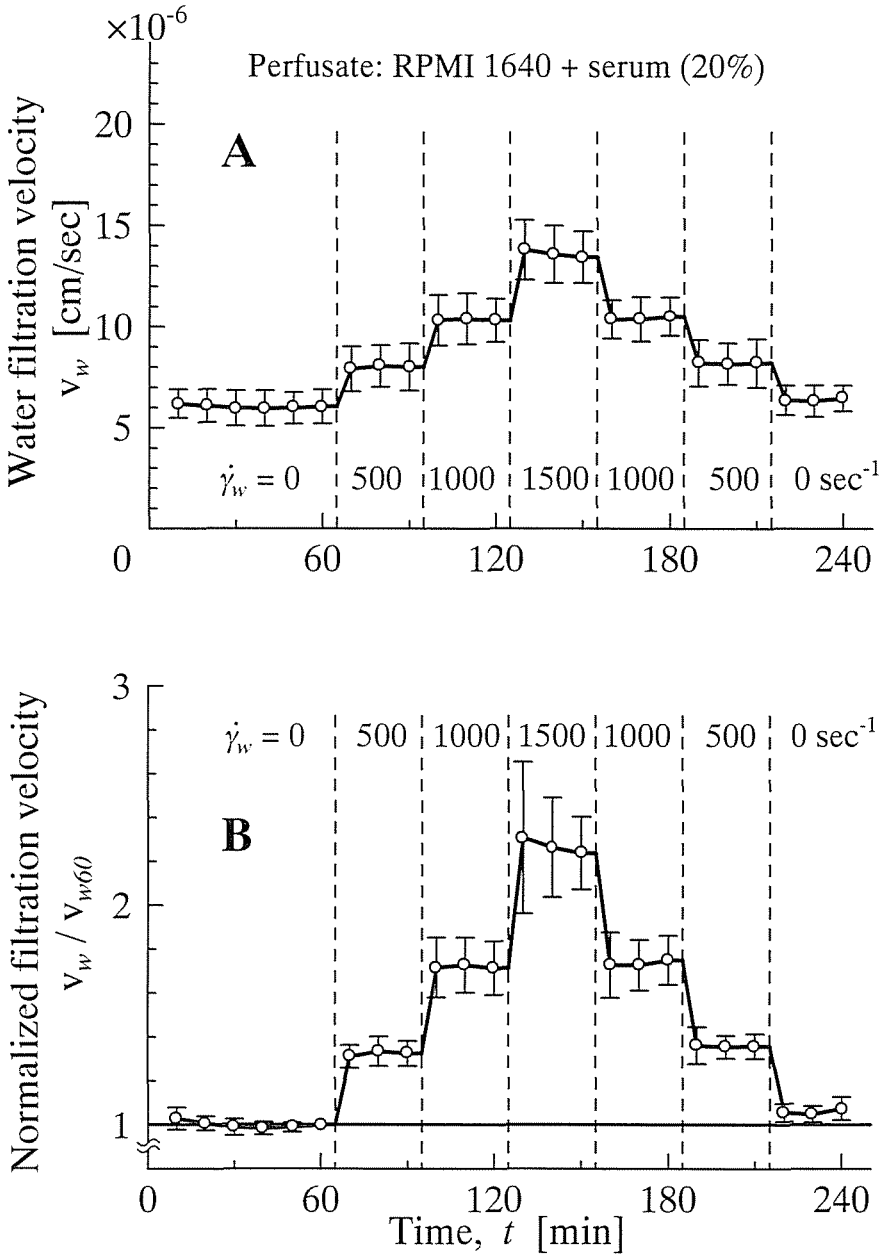

図３-６．体積濃度 20 %の血清を含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響

Time-dependent variations of water filtration velocities (A) and filtration velocities normalized by the values obtained 60 minutes after starting the flow experiment (B). Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Flow rate was changed 65, 95, 125, 155, 185, and 215 minutes after starting the flow experiment. Wall shear stresses calculated for shear rates of 500, 1000, 1500 sec^{-1} were 3.7, 7.5, and 11.2 $dynes/cm^2$, respectively. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 5.

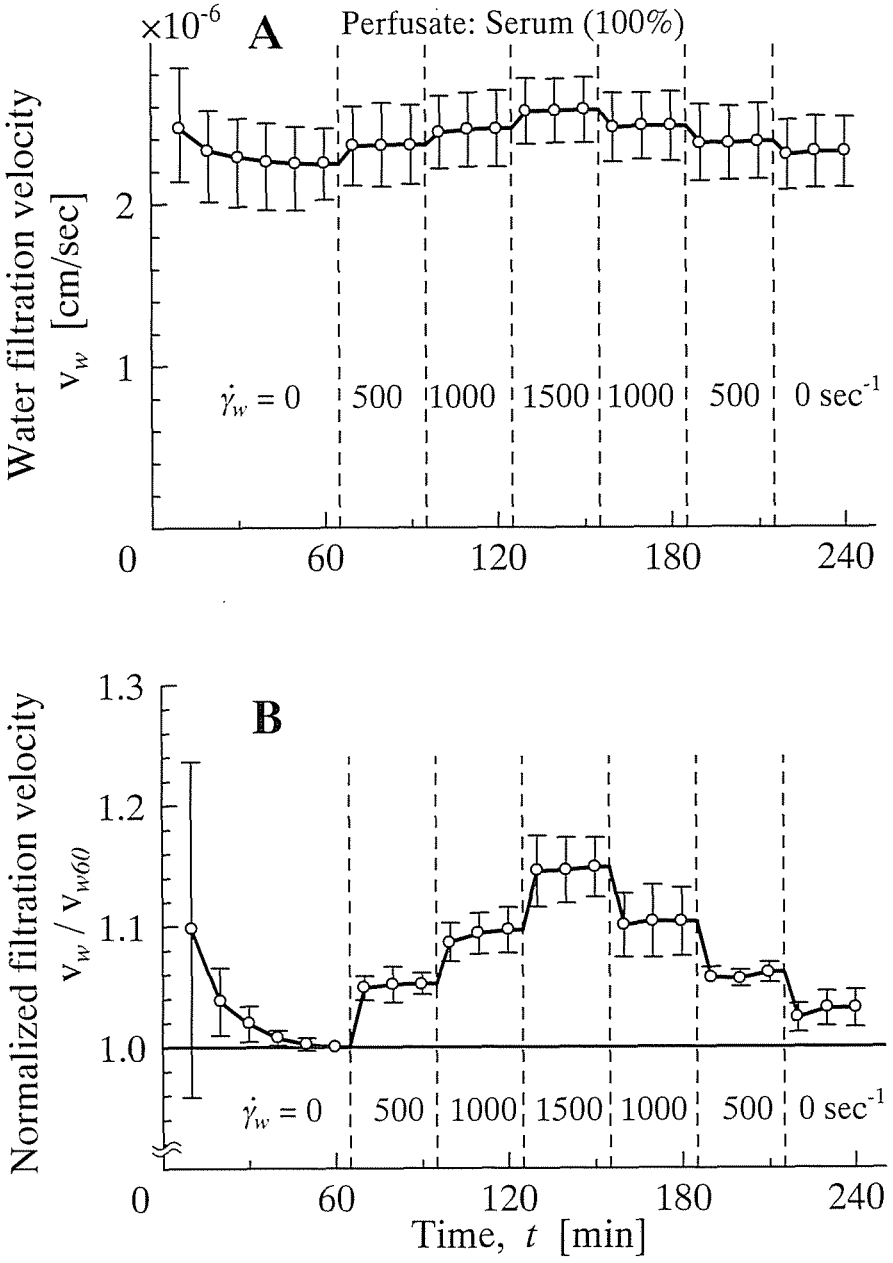

図３-７．血清を灌流液として用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響

Plot of measured filtration velocities against wall shear rates as Figs. 4 and 5, obtained with serum. Wall shear stresses calculated for shear rates of 500, 1000, 1500 sec^{-1} were 4.7, 9.5, and 14.1 $dynes/cm^2$, respectively. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 5.

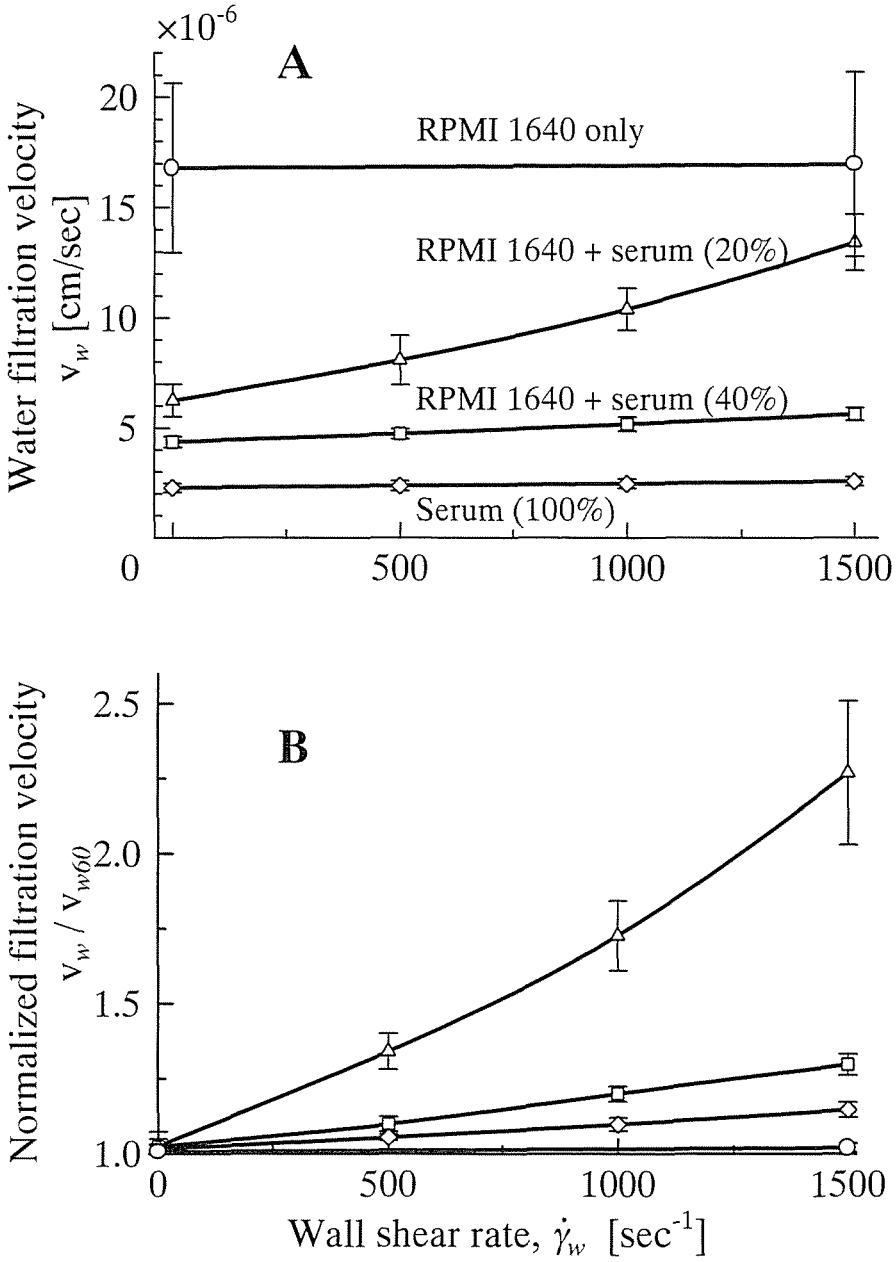

図３-８．種々の灌流液についての水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響

Effects of wall shear rate on water filtration velocity (A) and normalized water filtration velocity (B). The data were compiled from the results shown in Figs. 4 ~ 6, and presented as a mean ± SD. Additional data for a cell culture medium containing serum at 40 % by volume (n = 3) are included.

3.3.3. 水透過速度におよぼす巨大分子の大きさの影響

ウシ胎児血清は幾つかの異なる種類の巨大分子を含んでいる．アルブミンは直径1～5 nmであり，血清中に最も多く含まれている巨大分子である（ヒトの血清中で3.8 ~ 5.1 g/dℓ）．また，HDLとLDL，VLDLからなるリポ蛋白は，直径7.5～75 nmであり，アルブミンの次に多く含まれている巨大分子である（ヒトの血清中で約873 mg/dℓ）．これらの２種類の大きさの異なる巨大分子を含んだ液を用いて灌流実験を行い，血清中のどちらの巨大分子が，壁せん断速度に依存して水透過速度が変化するという巨大分子の流速依存性濃縮現象に寄与しているのかを調べた．実験は，それぞれの巨大分子の灌流液中の濃度を，体積割合で20 %の血清を含んだ灌流液中のそれぞれの巨大分子の濃度と同一になるように調整し．血清を含んだ灌流液を用いて行った実験と同じ要領で行った．

図３-９は，３種類の灌流液を用いて行った実験により得られた壁せん断速度と正規化した水透過速度との関係を示している．図から明らかなように，リポ蛋白のみを含んだ灌流液を用いた場合の結果は，血清を含んだ灌流液を用いて行った実験の結果とほとんど同じであった．このことは，血清を含んだ灌流液で観察された細胞単層における水透過速度の灌流流量に依存した変化が，血清中のリポ蛋白によって引き起こされていたことを示している．これに対し，アルブミンのみを含んだ灌流液で得られた結果は，ほかの２つの灌流液で得られた結果とはかなり異なり，水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響は，他の２つのリポ蛋白を含んだ灌流液の場合に比べ，ほとんど無視できるほど小さかった．

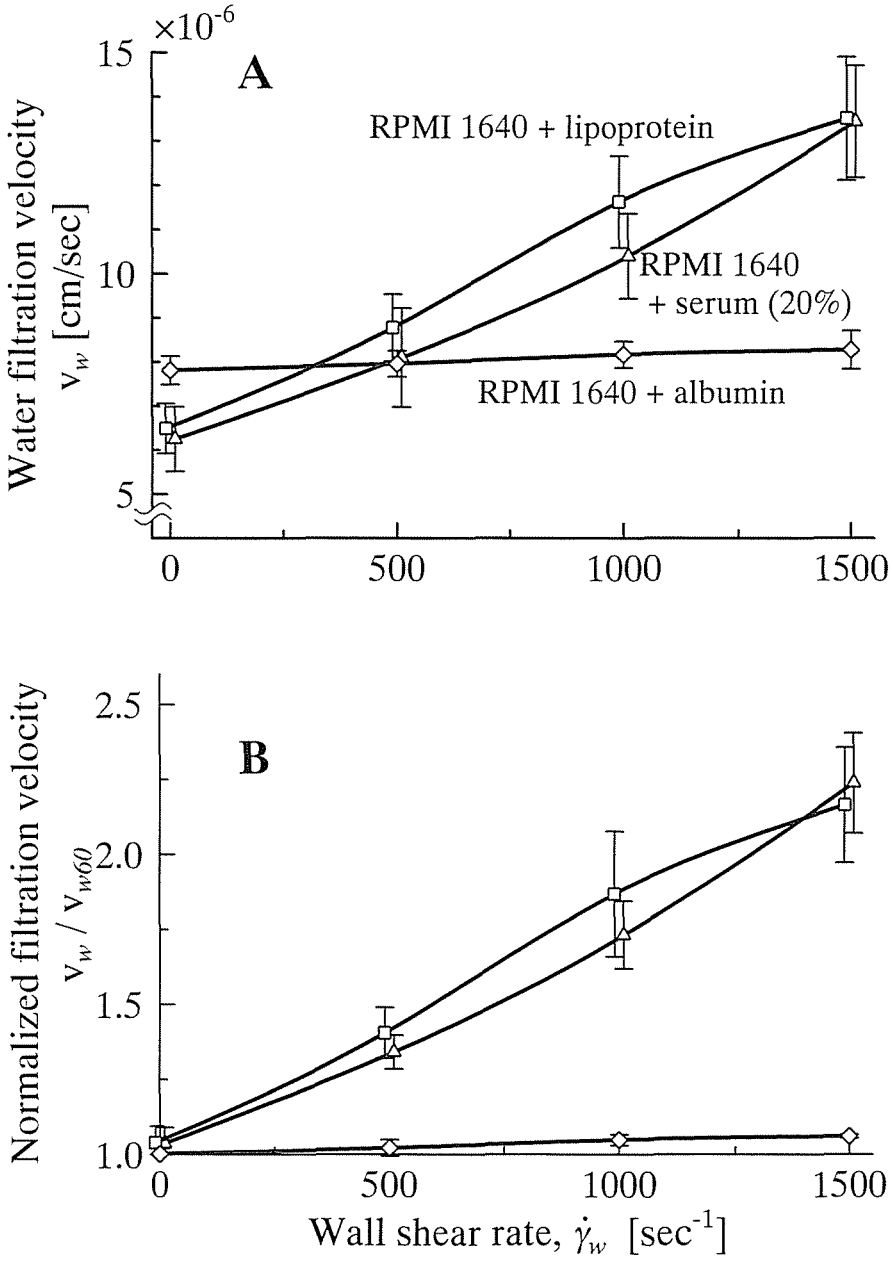

図３-９．リポ蛋白あるいはアルブミンのみを含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響

Plot of water filtration velocity (A) and normalized filtration velocity (B) against wall shear rate, showing the effect of particle size of macromolecule on filtration velocity. The data were obtained from filtration experiments carried out with a cell culture medium containing either bovine total plasma lipoproteins or bovine albumin. Wall shear stress calculated for shear rates of 500, 1000, and 1500 sec^{-1} were 3.6, 7.2, and 10.9 dynes/cm^2, respectively, for the case of a perfusate containing lipoproteins, and 3.7, 7.4, and 11.1 dynes/cm^2, respectively, for the case of a perfusate containing albumin. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 3 in all the cases. Data for a cell culture medium containing serum at 20 % by volume are same as those shown in Fig. 7.

3.4. 考察

3.4.1. 細胞単層表面上における巨大分子濃度の推定方法について

本研究の目的は，血管内皮のモデルとして用いた培養内皮細胞単層表面上における血漿蛋白やリポ蛋白の濃度におよぼすせん断流れの影響を調べることである．それゆえ本来であれば，その影響を直接細胞単層表面上の巨大分子濃度を測定することにより調べるのが望ましい．しかし，細胞単層表面近傍の極薄い濃度境界層における巨大分子の濃度を測定するのは，現在の技術では不可能である．まして，その濃度は主流による流速と，分子の拡散速度，細胞単層における水透過速度により決定されていて，それらのパラメータが変化してしまうと濃度も変化してしまうため，灌流液を流した状態のまま測定しなければならない．そこで，本研究では，細胞単層表面上における巨大分子の濃度により二次的に決定されている細胞単層における水透過速度を測定することにより，巨大分子の濃度を間接的に推定する方法を採用した．そのため，まずはじめに灌流液中の巨大分子（血清）の濃度と水透過速度との間の関係を調べ，巨大分子の濃度を増大することにより水透過速度が減小することを明らかにした．この結果は，細胞単層表面上における巨大分子の濃度のいかなる変化も直接水透過速度に反映され，それゆえ，水透過速度の変化を調べることにより細胞表面上における巨大分子の濃度の変化を知ることができることを意味している．本研究では現時点で可能であり，最も感度良く測定できる方法としてこの方法を用いて細胞単層表面上の巨大分子の濃度におよぼす定常せん断流れの影響を調べることにした．しかしながら，この方法には巨大分子の本当の濃度（絶対値）を知ることができないという欠点がある．

3.4.2. 細胞単層における水透過速度に影響をおよぼす要因について

灌流液中に血清やリポ蛋白を混入すると，細胞単層における水透過速度が壁せん断速度（あるいは灌流流量，壁せん断応力）に依存して変化することが明らかになった．驚くべきことに，この現象は灌流液にリポ蛋白を混入した場合にのみ観察された．すなわち，この現象は血清を含まない培養液やアルブミンのみを含んだ培養

液を灌流液として用いたときには観察されなかった．さらに，血清を体積濃度で20％の割合で含んだ灌流液を用いた場合と，その中に含まれているリポ蛋白だけを培養液に混入し灌流液として用いた場合の結果はほとんど同じであった．これらの結果は，リポ蛋白がこの現象を引き起こす中心的な成分であることを示している．水透過速度が流速に依存して変化するメカニズムとして第一に考えられることは細胞単層両面間の膠質浸透圧差である．しかし，装置の組み立ての段階で細胞単層の両側にはまったく同じ液を満たしているので，実験開始前には膠質浸透圧差は生じていないはずである．また，灌流速度の変化により細胞単層近傍の物質の濃度が変化しない限り，膠質浸透圧差は生じていないはずである．次に考えられるのが細胞単層を水が透過する際の抵抗を決定する溶液の粘性係数の影響である．しかし，これについても同様で，細胞単層近傍の溶液中の物質，とくに巨大分子の濃度が変化しない限り，その溶液の粘性係数も変化しないはずである．その他の要因として，せん断応力負荷により起こる内皮細胞の形態の変化によって細胞間隙が広がってしまっていることや，Davies et al. (1984)が報告したように，せん断応力を負荷することによって内皮細胞の小胞による飲作用速度が変化していることが考えられる．しかし，血清を含まない灌流液を使用した場合には灌流速度を変化させても水透過速度がまったく変化しなかったことから，これらの現象は生じていないことがわかる．同様に，血漿蛋白やリポ蛋白が内皮細胞表面や間隙に吸着して堆積し，水の透過経路を狭めてしまうような不可逆的な現象が起こっている可能性も考えられるが，水透過速度の変化には可逆性があったので，その影響も関係ないと考えられる．以上のことより，本研究で見られた現象は，血管内皮細胞単層表面上において流速に依存したリポ蛋白の濃縮現象が生じていて，これにより引き起こされた現象であると結論付けた．

3.4.3. リポ蛋白の見かけ表面濃度の流速による変化

前項において，図３-６と図３-７で見られた水透過速度の段階的な変化は，細胞単層表面上のリポ蛋白の濃度の変化を反映していると結論付けられたので，図３-４の灌流液中のリポ蛋白濃度と水透過速度との関係を用い，リポ蛋白の表面濃度におよぼす灌流速度の影響を知ることができる．このようにして作成したのが図

３-１０である．細胞単層における水透過速度を決定しているのは表面濃度であるため，この図ではリポ蛋白濃度をリポ蛋白の見かけの表面濃度として表記している．また，別の言い方をすれば，いくら灌流速度を変化させても透過する水分は全体の量から比べれば極わずかであるので，灌流液中におけるトータルのリポ蛋白濃度が変化するはずがなく，細胞単層近傍でのリポ蛋白の濃度だけが変化していると考えられる．ここで，見かけの表面濃度とは，ある条件下における表面濃度と，灌流のない状態で同じ表面濃度になる灌流液中の濃度という意味で本研究では用いた．例えば，血清の見かけの表面濃度が 30 %とは，その時の巨大分子の表面濃度が血清を 30 %の割合で含んだ灌流液を灌流させない状態で加圧のみを行った時に生じる表面濃度と等しいことを意味している．

図からわかるように，全ての場合において，壁せん断速度の減小によりリポ蛋白の見かけの表面濃度は増加し，その変化する度合いは血清濃度の小さい灌流液ほど大きくなっている．流速に依存した濃縮現象が血清のみを灌流した場合でも生じることは重要な結果である．過去に内皮細胞単層や毛細血管壁における水分の透過率(hydraulic conductivity)におよぼすアルブミン濃度の影響を調べた報告は数多い(Dull et al., 1991; Lum et al., 1991; He and Curry, 1993)．しかし，水透過速度におよぼす流れやせん断速度，せん断応力の影響を調べた研究はほとんどなく，報告書として出されているのは唯一，家兎総頸動脈における水透過量におよぼす定常流れの影響を調べた Caro et al. (1985)のアブストラクトだけである．彼らは，1～4 %の濃度でアルブミンを含んだクレブス・リンゲル液を 1.5 dynes/cm^2 の壁せん断応力に相当する流量で血管内に流したところ，血管壁を透過する液量が約 30 %増加したと報告している．使用したアルブミンの濃度が本研究での濃度よりかなり高いため，定量的には比較できないが，流量変化の影響としては本研究で得られた結果と同じである．

3.4.4. 巨大分子の大きさの影響

本章では，血管内皮細胞単層における水透過速度の流速に依存した変化に，リポ蛋白が主要な役割をしていることを示した．血清中に最も多く含まれている巨大分子であるアルブミンは，この現象にはほとんど関与していなかった．これらの結果

は，まさに Wada and Karino (1999)による数値計算によって予測された通りである．彼らの計算結果は，分子の拡散係数が小さいこと，すなわち分子のサイズが大きいことが流速依存性濃縮現象を発生させるための重要な因子の一つであることを示している．リポ蛋白はアルブミンに比べて大きいため，その拡散係数はアルブミンに比べて小さい．それゆえに，リポ蛋白の濃縮度合いはアルブミンの濃縮度合いに比べて高いと考えられる．このように考えると，リポ蛋白の中でも VLDL が最も濃縮度合いが高く，LDL がそれに続くであろう．しかし，血漿中の VLDL の濃度は LDL や HDL に比べてかなり小さいため，生体の循環系内では LDL の流速依存性濃縮現象が最も顕著に現れると考えられる．LDL には動脈硬化症を発症させるコレステロールが多く含まれていて，この濃度が壁せん断速度の低い部位で慢性的に高くなっていることが，動脈硬化病変の局所的発症を引き起こしていると思われる．

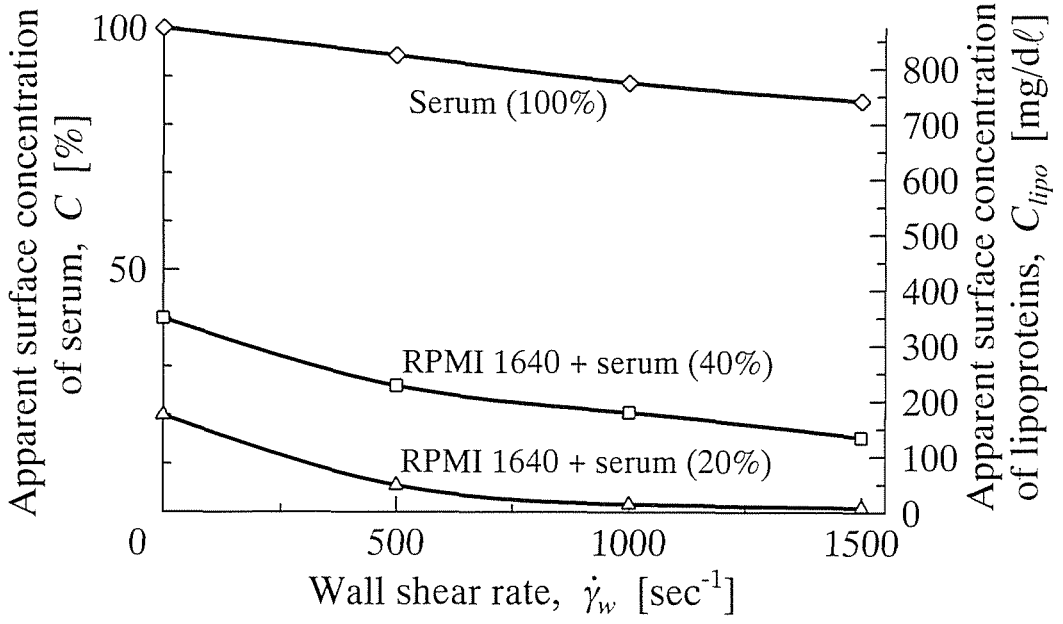

図３-１０．血清の見かけ表面濃度におよぼす壁せん断速度の影響

The apparent concentrations were estimated from the relationship between the concentration of serum or lipoprotein and water filtration velocity shown in Fig. 3-4.

3.5. 結言

本章では，培養血管内皮細胞単層を血管壁のモデルとして用い，その単層を透過する水分の透過速度を幾つかの条件下で測定した結果以下のことがわかった．

1) 灌流液中の血清濃度，リポ蛋白濃度が大きいほど水透過速度は小さい．
2) 血清を含んだ溶液では，灌流速度が大きくなるほど水透過速度も大きくなる．
3) (2)の現象にはアルブミンよりリポ蛋白の影響が大きい．
4) (2)の現象は流量の変化により可逆的に起こる．

以上の結果に基づいて総合的に考察した結果，壁せん断速度が小さいほど内皮細胞単層表面上でのリポ蛋白の濃度が高くなっていることがわかり，このリポ蛋白の流速依存性濃縮現象が，動脈硬化病変の局所的発症を引き起こす要因になっている可能性があることが強く示唆された．

参考文献

ASAKURA, T., and KARINO, T. (1990). Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ. Res.* **66**, 1045-1066.

BERCELI, S.A., WARTY, V.S., SHEPPECK, R.A., MANDARINO, W.A., TANKSALE, S.K., and BOROVETZ, H.S. (1990). Hemodynamics and low density lipoprotein metabolism: Rates of low density lipoprotein incorporation and degradation along medial and lateral walls of the rabbit aorto-iliac bifurcation. *Arteriosclerosis* **10**, 688-694.

BLATT, W.F., DRAVID, A., MICHAELS, A.S., and NELSEN, L. (1970). Solute polarization and cake formation in membrane ultrafiltration: causes, consequences, and control techniques. In: *Membrane Science and Technology.* J.E. Flynn Ed., Plenum, New York, pp.47-97.

CARO, C.G., FITZ-GERALD, J.M., and SCHROTER, R.C. (1971). Atheroma and arterial wall shear: Observation, correlation and proposal of a shear dependent mass transfer mechanism for atherogenesis. *Proc. Roy. Soc. Lond.* **B. 177**, 109-159.

CARO, C.G., LEVER, M.J., and TARBELL, J.M. (1985). Effect of luminal flow rate on transmural fluid flux in the perfused rabbit common carotid artery. In: *Proc. Physiol. Soc.* (March), 92P.

COLTON, C.K., FRIEDMAN, S., WILSON, D.E., and LEES, R.S. (1972). Ultrafiltration of lipoproteins through a synthetic membrane. *J. Clin. Invest.* **51**, 2472-2481.

DAYTON, S., and HASHIMOTO, S. (1970). Recent advances in molecular pathology: A review. Cholesterol flux and metabolism in arterial tissue in atheroma. *Exp. Mol. Pathol.* **13**, 253-268.

DAVIES, P.F., DEWEY, C.F. Jr., BUSSOLARI, S.R., GORDON, E.J., and GIMBRONE, M.A. Jr. (1984). Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function. *J. Clin. Invest.* **73**, 1121-1129.

DENG, X.-Y., MAROIS, Y., HOW, T., MERHI, Y., KING, M., GUIDOIN, R., and KARINO, T. (1995b). Luminal surface concentration of lipoprotein (LDL) and its effect on the wall uptake of cholesterol by canine carotid arteries. *J. Vasc. Surg.* **21**, 135-145 and **22**, 9A and 648.

DULL, R.O., JO, H., SILL, H., HOLLIS, T.M., and TARBELL, J.M. (1991). The effect of varying albumin concentration and hydrostatic presure on hydroulic conductivity and albumin permeability of cultured endothelial monolayers. *Microvascular Res.* **41**, 390-407.

DUNCAN, L.E., BUCK, K., and LYNCH, A. (1963). Lipoprotein movement through canine aortic wall. *Science* **142**, 972-973.

FRIEDMAN, M.H., HUTCHINS, G.M., BARGERON, C.B., DETERS, O.J., and MARK, F.F. (1991). Correlation of human arterial morphology with hemodynamic measurements in arterial casts. *ASME J. Biomech. Eng.* **103**, 204-207.

HAYASHI, K., YANAI, Y., and NAIKI, T. (1996). A 3D-LDA study of the relation between wall shear stress and intimal thickness in a human aortic bifurcation. *ASME J. Biomech. Eng.* **118**, 273-279.

HE, P., and CURRY, F.E. (1993). Albumin modulatin of capillary permeability: role of endothelial cell $[Ca^{2+}]_i$. *Am. J. Physiol.* **265** (*Heart Circ. Physiol.* **34**), H74-H82.

JAFFE, E.A. (1984). Culture and identification of large vessel endothelial cells. In: *Biology of endothelial cells*. E.A. Jaffe Ed., Martinus Nijhoff Publishers, Netherlands, pp.1-13.

KARINO, T., and DENG, X. (1990). Lipoprotein concentration at the blood-endothelium boundary and its implications for the pathogenesis of vascular diseases. *J. Japanese College of Angiology* **30**: 710.

KARINO, T., and DENG, X. (1993). A hypothesis for the pathogenesis of atherosclerosis: Flow-dependent concentration polarization of lipoproteins at the blood-endothelium boundary. In: *Proc. Jikei University Medical School Symposium on Hemorheological Study on Microcirculatory Disturbances and Dysfunction of Vascular Endothelial Cells.* Y. ISOGAI Ed. Medical Review Inc., Tokyo: pp. 35-42.

KARINO, T., DENG, X., and NAIKI, T. (1995a). Flow-dependent concentration polarization of lipoproteins at the blood-endothelium boundary. *ASME BED* **29**: 13-14.

KU, D.N., GIDDENS, D.P., ZARINS, C.K., and GLAGOV, S. (1985). Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. *Arteriosclerosis* **5**, 293-302.

LUM, H., SIFLINGER-BIRNBOIM, A., BLUMENSTOCK, F., and MALIK, A.B. (1991). Serum albumin decreases transendothelial permeability to macromolecules. *Microvascular Res.* **42**, 91-102.

NAIKI, T., HAYASHI, K., and TAKEMURA, S. (1995). A LDA and flow visualization study of pulsatile flow in an aortic bifurcation model. *Biorheology* **32**, 43-59.

ROSS, R. (1986). The pathogenesis of atherosclerosis - an update. *New Engl. J. Med.* **314**, 488-500.

SCHWARTZ, C.J., and MITCHELL, J.R.A. (1962). Observations on localization of arterial plaques. *Circ. Res.* **11**, 63-73.

SCHWENKE, D.C., and CAREW, T.E. (1988). Quantification in vivo of increased LDL content and rate of LDL degradation in normal rabbit aorta occurring at sites susceptible to early atherosclerotic lesions. *Circ. Res.* **62**, 699-710.

SMITH, E.B., and STAPLES, E.M. (1980). Distribution of plasma proteins across the human aortic wall. *Atherosclerosis* **37**, 579-590.

SPAIN, D.M. (1966). Atherosclerosis. *Scientific American* **215**, 48-56.

WADA, S., and KARINO, T. (1999). Theoretical study on flow-dependent concentration polarization of low density lipoproteins at the luminal surface of a straight artery. *Biorheology* **36**, 207-223.

第4章 水透過速度測定による半透膜内表面上における巨大分子の流速依存性濃縮現象の解析

4.1. 緒言

前章では，血管内皮のモデルとして培養血管内皮細胞単層を，そして血漿の代用としてリポ蛋白を含んだ細胞培養液を用いて定常流下で流れの実験を行い，内皮細胞単層における水透過速度におよぼす灌流速度の影響について検討を行った．その結果，水透過速度がリポ蛋白の濃度や灌流速度に依存して変化することがわかった．そこで，この内皮細胞単層における水透過速度が流速に依存して変わるという現象は Wada and Karino (1999) によるコンピュータ・シミュレーションにより示唆されたように内皮細胞単層の表面上にリポ蛋白の濃縮層が形成されるために起こると結論付けた．しかしながら血管内皮細胞は，壁せん断応力の負荷によりいろいろな機能の変化を引き起こすことが知られており，この水透過速度の変化が内皮細胞の小胞による水分や血漿蛋白，リポ蛋白の輸送能が変化したことによるとも考えられる．そこで，内皮細胞単層で観察された水透過速度の変化が，リポ蛋白の濃縮という単純な物理現象によって引き起こされたのであるかどうかを調べるため，細胞のない透析用半透膜を動脈壁のモデルとして用いて灌流実験を行うことにした．過去には，Colton et al. (1972) が動脈壁のモデルとして半透膜を用いてリポ蛋白の限外濾過の実験を行っている．彼らは半透膜における水分の限外濾過におよぼすリポ蛋白分子の影響を調べ，膜の表面で LDL や VLDL などの巨大分子が濃縮され，濃度分極（concentration polarization）が起こることによって水の濾過速度が低下することを示した．彼らは，灌流圧の影響のみを調べ，灌流流量の影響までは調べなかった．本研究では，半透膜チューブを動脈のみならず，動脈系に移植された人工血管のモデルとしても考え，その管壁における水分の透過速度におよぼす灌流速度の影響を調べ，巨大分子の濃縮現象との関連について検討した．実験は，動脈硬化症のみならず，自家静脈や人工血管を動脈系に移植した際に生じる内膜肥厚の問題をも念頭において，生体血管における水透過速度の約１０倍ほどの水透過速度の条件下で行った．

4.2. 実験方法

4.2.1. 水透過速度測定装置および灌流装置

透析用の半透膜チューブ(Spectra/Por CE MWCO 500,000, Spectrum, Los Angeles, CA)を動脈および移植した低ポロシティの人工血管のモデルとして用いた. 図４-１は, この透析膜チューブにおける水透過速度を測定するために作製した密閉式チャンバの断面を示している. この装置は, ①直径(d) = 0.75 cm, 長さ= 8.3 cm（水透過実験における有効長さ l = 6.0 cm）の透析膜チューブ, ②内径 = 1.9 cm, 内寸長さ = 9.8 cm のアクリル製円筒, ③内径 0.60 cm, 外形 0.70 cm のパイプ状の突起を持つ１対のステンレス製キャップ, ④メスピペット, ⑤三方活栓, ⑥ステンレス製基底板から成っている. メスピペットは透析膜チューブを透過した液体の流量を測定するのに用いた.

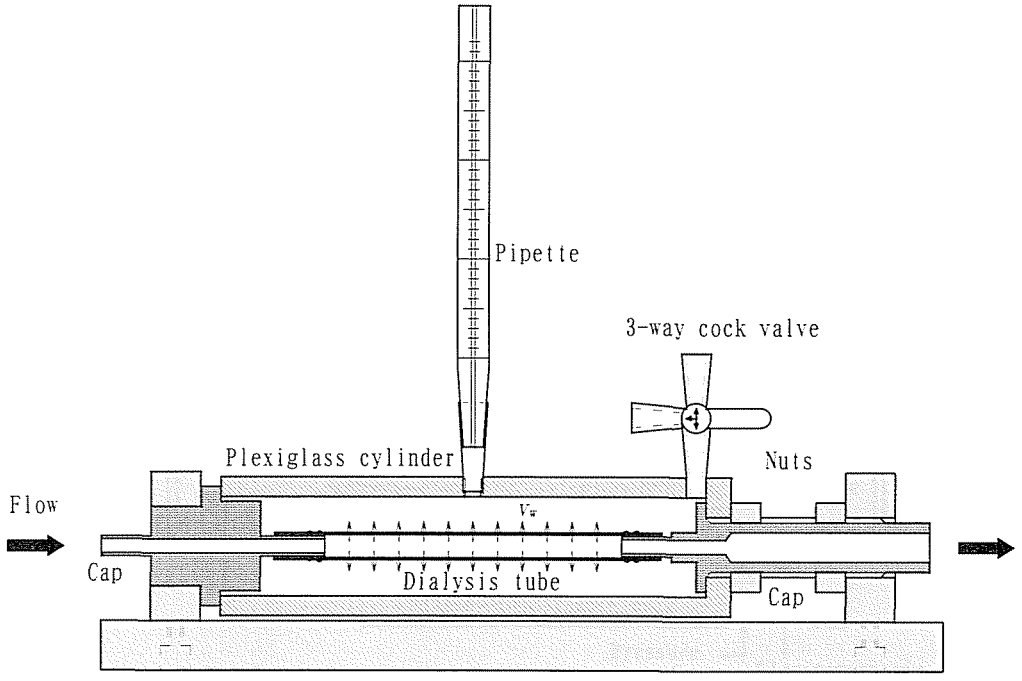

図４-１. 水透過速度測定装置の縦断面図

A dialysis membrane tube was sleeved and tightly tied with silk thread onto the tubular protrusion of the stainless steel inlet and outlet caps which served as inlet and outlet ports and installed in a Plexiglass cylinder, forming a closed chamber. Silicone gaskets were placed between the caps and the chamber, and two nuts on the screw engraved on the external surface of the tubular protrusion of the outlet cap were tightened to prevent leakage of a liquid filled in the chamber. Filtration rate of water through the semipermeable membrane was obtained by measuring the time during which the meniscus of the liquid passed between two lines in a graduated pipette attached to the top middle of the chamber.

図４-２は本研究で使用した灌流装置の模式図である．この装置は，オーバフロー・ヘッドタンク，先に説明したアクリル製密閉式チャンバ，ニードル弁，リザーバ・タンク，ローラ・ポンプによって構成されている．これらの構成要素を接続するのに，タイゴン・チューブを用いた．アクリル製密閉式容器内に取り付けた透析膜チューブ内に十分に発達したポアズイユ流れが形成されるように，密閉式容器の上流に長さ 20 cm，内径が密閉式容器の流入ポートと同じ 0.6 cm のステンレス・パイプを取り付けた．さらに，灌流流量と灌流圧を制御する目的で，ニードル弁を密閉式容器の流出ポートの下流に取り付けた．ローラ･ポンプは，リザーバ・タンク内に貯まる灌流液をオーバフロー･ヘッドタンクへ戻すのに用いた．灌流流量と灌流圧の測定には，電磁流量計(MVF-3100, Nihon Kohden, Tokyo)と圧力トランスデューサ(AB/HP-6psiG, Data Instruments, Acton, Mass)をそれぞれ用いた．温度を完全に一定に保つために，密閉式容器全体を室温に保った恒温水槽内に沈めた．また，

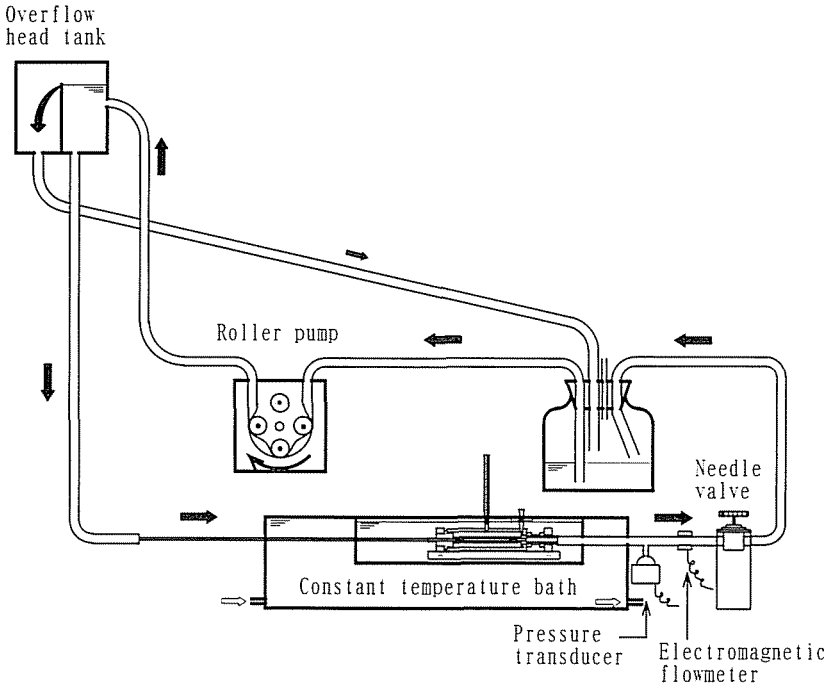

図４-２．灌流装置の概略図

Perfusate flowed from an overflow head tank to a reservoir bottle passing through a 20.3 cm long straight stainless steel pipe and a dialysis tube. The perfusate in the reservoir bottle was returned to the overflow head tank by a roller pump. The flow rate was controlled by adjusting the height of the overflow head tank and the resistance of a needle valve so that both a desired flow rate and a desired pressure could be achieved simultaneously. An electromagnetic flowmeter and a pressure transducer were used to measure the flow rate and perfusion pressure at the outlet position of the dialysis tube, respectively.

実験装置内の灌流液が触れる部分については，全て，実験前に蛋白除去用の洗剤で洗い，脱イオン水ですすぎ，生化学的にクリーンな状態にした．

4.2.2. 灌流液

水透過速度におよぼす灌流液中の血清濃度や灌流速度の影響を調べるための灌流液としてウシ胎児血清 (Biological Industries, Beth Haemek, Israel) を 0，5，100 % の体積割合で含んだ細胞培養液(RPMI 1640 R-6504, Sigma Chemicals, St. Louis, MO) を用いた．さらに，灌流液中に混入する巨大分子の大きさの影響を調べるために，43.7 mg/dℓのウシ血漿リポ蛋白 (89.9 % HDL and 9.4 % LDL; L-3626, Sigma Chemicals) のみを含んだ培養液や 235 mg/dℓのウシ・アルブミン (A-7284, Sigma Chemicals) のみを含んだ細胞培養液も灌流液として用いた．これらの灌流液中の各巨大分子の濃度は，体積濃度で 5 %の血清を含んだ灌流液中のそれぞれの巨大分子の濃度と同一になるようにとした．

4.2.3. 実験手順および解析

透析膜チューブを 24 時間以上蒸留水に浸漬した後，密閉式容器の流入，流出のポートとして用いる入口，出口のキャップのパイプ状の突起に被せ，絹糸できつく縛り，図４-１のように密閉式容器内に挿入した．その際に，容器を完全に密閉するために，それぞれのキャップとアクリル製円筒容器の間に，シリコンゴムで作製したガスケットを挟み込んだ．出口キャップの外側の突起にはネジが切ってあり，そこに２つのナットを取り付け，密閉式容器を基底板に装着した後にその２つのナットを締めて容器を固定した．リザーバ･タンクに 350 mℓ の灌流液を満たし，恒温槽内に沈めた．アクリル製密閉式容器にも同じ溶液を入れ，容器内の空気を三方活栓から押し出した．その後，流入，流出ポートをそれぞれステンレス･パイプとニードル弁にタイゴン･チューブで接続し，密閉式容器を恒温槽内に沈めた．それから数十分後，灌流液が一定の温度に達した後に，ローラ･ポンプをスタートさせ，灌流液を透析膜チューブ内に流入させた．流路内の空気をすべて除去し，オーバフ

ロー・ヘッドタンクの高さと，ニードル弁の開き度合いを調節して，灌流流量と灌流圧を同時に設定したい値になるように調整した．全ての実験において，灌流圧を100 mmHg に設定し，透析膜チューブにおける水透過速度を 2.0×10^{-5}～1.3×10^{-4} cm/sec の範囲内になるようにした．この水透過速度はイヌ総頸動脈で測定した値の約 10 倍であるが，自家静脈や移植した人工血管における値と同程度の値である．

透析膜チューブにおける濾過液の流量は，密閉式容器の上部に取り付けたメスピペット内に V_m = 0.05 mℓの濾過液が入るのにかかる時間(t_m)を一定時間おきに計測して求めた．この濾過液の流量を透析膜チューブの内表面積($S = \pi dl$)で割ることにより水透過速度(v_w)を算出した．

$$v_w = V_m / (t_m \times S)$$

１つの測定値を求めるのに数回連続して測定し，その平均値をその時の測定値とした．毎回測定後にはメスピペットの下につけたドレイン・チューブからメスピペット内の液を流し出し，測定開始時の液面の位置を常に一定にした．水透過速度の測定と同時に恒温槽内の密閉式容器近傍の温度も測定した．実験は毎回新しい透析膜チューブを用い，同じ条件下で３回行い，その結果を平均値±標準偏差で表した．二つの平均値の間の有意差の検定は，両側 t 検定を用いて行った．全ての実験は室温である 24.0 ± 1.0 °C で行った．

各灌流液の粘性係数は，濾過実験と同じ温度において，回転円錐粘度計(DV-II, Brookfield Eng. Lab. Inc., Stoughton, Mass)を用いて測定した．

4.3. 実験結果

4.3.1. 水透過速度におよぼす流量の影響

図４-３Ａは，３種類の灌流液を２通りの灌流流量で流したときの水透過速度の時間変化を示している．図４-３Ｂは，同じデータを各実験毎に実験開始後５分時のデータで正規化した値を示している．図より明らかなように，血清を含んだ灌流液の場合には，水透過速度は灌流量の大小によって大きな影響を受け，その値は流量が大きいほど大きいことがわかった．しかしながら，灌流流量が 100 mℓ/min 以上においては，水透過速度の値におよぼす灌流流量の影響はほとんどなかった．そこで，図には灌流流量が 0 と 300 mℓ/min の時の結果だけを示した．何も含まない灌流液や体積割合で 5 %の血清を含んだ灌流液，および血清の 24.0 °C における粘性係数は，それぞれ 1.0，1.5，1.9 cP であった．

何も含まない灌流液（培養液のみ）を使用した場合は，灌流することによって水透過速度が変化するという現象は見られなかった．このことは，灌流液中に巨大分子が含まれていないと，流れは水透過速度になにも影響を与えないことを示している．一方，血清を含んだ灌流液の場合には，すでに述べたように灌流したときの水透過速度やその正規化した値は，流れのある時の方が流れのない時より有意に高い値を示し，両灌流条件下における水透過速度の間には，全ての実験期間において有意差 ($p < 0.05$) が存在していた．同様の結果が正規化したデータからも得られた．

表４-１に，水透過速度がほぼ安定した値になる実験開始より４時間後の値をもとにして，種々の灌流液によって水透過速度におよぼす灌流の影響をまとめた．この結果からも明らかなように，血清を含んだ灌流液では灌流流量の影響が有意に現れているが，血清を含まない灌流液では有意な差がないことがわかった．また，流量 300 と 0 mℓ/min の時の水透過速度の比 (v_{w300} / v_{w0}) は，灌流液中の血清濃度が高いほど大きな値を示すことがわかった．

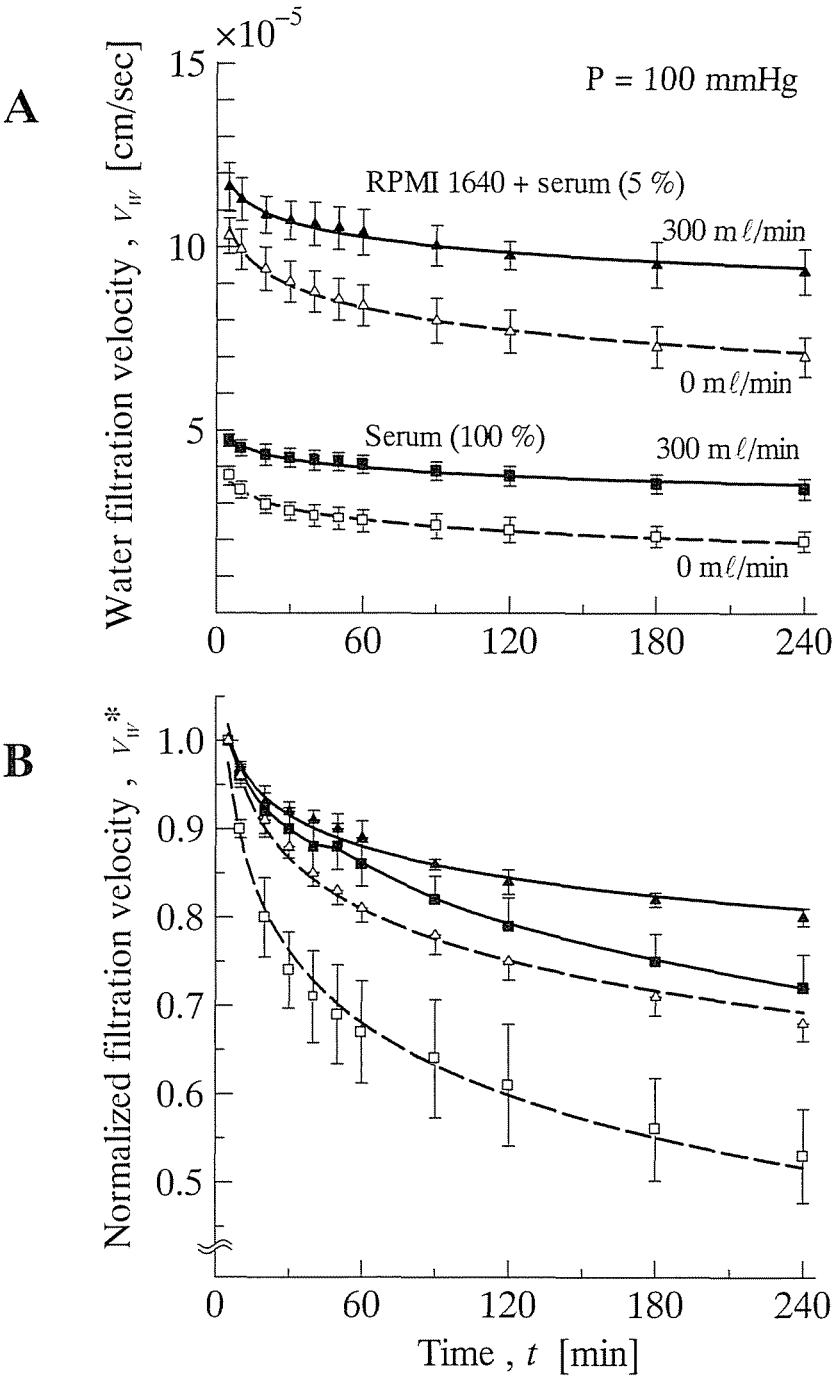

図４-３．血清を含んだ灌流液を用いた場合の透析膜における水透過速度の時間変化

Time-dependent variations of water filtration velocities (A) and filtration velocities normalized by the values obtained 5 minutes after starting the flow experiment (B). Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 5 % by volume (△, ▲) and pure fetal calf serum(□, ■). Empty symbols show the results obtained under non-flowing conditions, and filled symbols obtained at a flow rate of 300 mℓ/min. Wall shear stresses calculated for the flow of a cell culture medium containing serum at 5 % by volume and pure fetal calf serum were 1.8 and 2.3 dynes/cm^2, respectively. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 3.

表４-１．水透過速度におよぼす灌流流量の影響

Comparison of water filtration velocities obtained at 4 hours after starting the filtration experiments under two different flow conditions

Perfusate	$V_{w0}\times10^5$ [cm/sec] Q = 0 [mℓ/min]	$V_{w300}\times10^5$ [cm/sec] Q = 300 [mℓ/min]	V_{w300}/V_{w0}	
RPMI 1640 only	11.74 ± 0.33	11.51 ± 0.26	0.98	*N.S.*
	(0.96 ± 0.03)	(0.91 ± 0.01)	(0.94)	$p<0.05$
RPMI 1640	7.01 ± 0.54	9.33 ±0.62	1.33	$p<0.01$
+ serum (5 %)	(0.68 ± 0.02)	(0.80 ± 0.01)	(1.18)	$p<0.001$
Serum only	1.97 ± 0.28	3.40 ± 0.29	1.72	$p<0.005$
	(0.53 ± 0.05)	(0.72 ± 0.04)	(1.37)	$p<0.01$
RPMI 1640	8.15 ± 0.25	11.48 ± 0.14	1.41	$p<0.001$
+ lipoprotein	(0.70 ± 0.03)	(0.93 ± 0.02)	(1.33)	$p<0.001$
RPMI 1640	9.65 ± 0.08	12.61 ± 0.47	1.31	$p<0.001$
+ albumin	(0.85 ± 0.02)	(0.97 ± 0.02)	(1.15)	$p<0.005$

V_{w0} and V_{w300} denote the filtration velocity obtained at flow rates 0 and 300 mℓ/min, respectively.
Data in parentheses are water filtration velocities normalized by the values evaluated at 5 minutes.
Data are presented as a mean ± SD for n = 3.

4.3.2. 水透過速度におよぼす灌流液中における巨大分子の濃度の影響

図４-３Ａおよび Ｂから明らかなように，血清を含んでいる灌流液の場合には，実験開始からの時間が経つにつれて，水透過速度は徐々にではあるが減少していくことがわかった．また同一の灌流条件下では，灌流液中における血清の濃度が大きいほど，水透過速度の減少する度合いが大きいことがわかった．灌流液中に血清を含んでいない場合の水透過速度はこれらの値よりも高く，最初の値と比較してもほとんど変化していなかった（表 3-1）．この水透過速度におよぼす灌流液中の血清濃度の影響について，実験開始時より４時間後の値で正規化したデータを元にしてまとめたのが図４-４である．この図から，灌流液中の血清濃度，すなわち巨大分子の濃度が大きいほど，水透過速度の値が小さいことが明らかである．

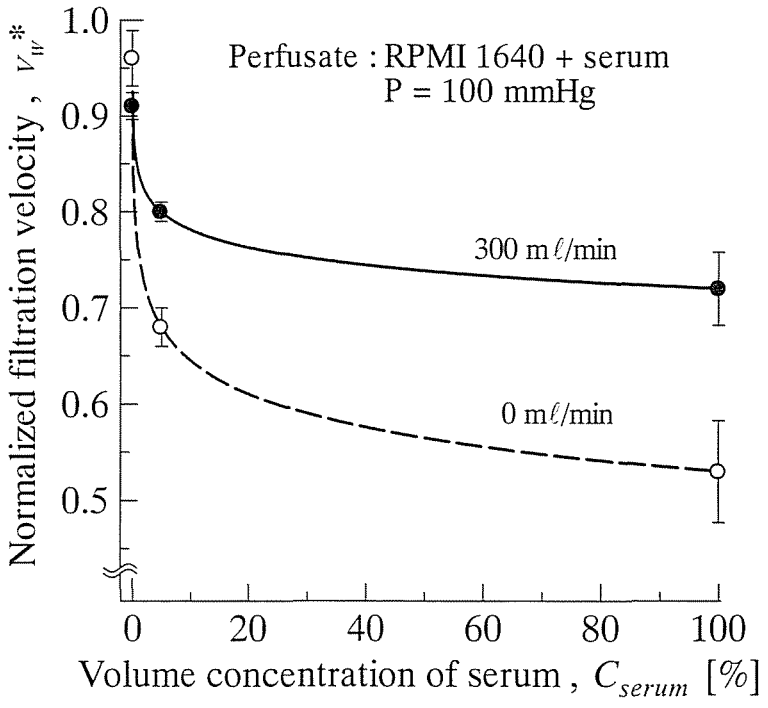

図４-４．水透過速度におよぼす灌流液中の血清濃度の影響

Effects of serum concentration on water filtration velocity assessed from the filtration velocities obtained 4 hours after starting the filtration experiment. Empty circles (○) show the result obtained under non-flowing conditions, and filled circles (●) obtained at a flow rate of 300 mℓ/min. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 3.

4.3.3. 水透過速度におよぼす巨大分子の大きさの影響

図４-５Ａおよび Ｂは，それぞれ３種類の灌流液を用いて実験を行った場合の水透過速度の時間変化とその正規化した値を示している．この実験で用いた灌流液は，体積割合で５％の血清を含んだ灌流液と，235 mg/dℓのウシ・アルブミンを含んだ灌流液，43.7 mg/dℓのウシ血漿リポ蛋白を含んだ液である．これらの灌流液のうち，アルブミンのみを含んだ灌流液とリポ蛋白のみを含んだ灌流液の 24.0 °C における粘性係数は，それぞれ 1.8，1.0 cP であった．この実験でも２つの灌流条件についてその影響を調べた．

灌流しない状態での測定値を比較してみると，リポ蛋白のみを含んだ灌流液の正規化した水透過速度の値は，５％の血清を含んだ灌流液での値とほぼ同じであるが，アルブミンのみを含んだ灌流液での値はそれらよりはかなり高い値であった．灌流流量の影響については，前項と同じく表４-１にまとめてある．それによると，リポ蛋白のみを含んだ灌流液のみならず，アルブミンのみを含んだ灌流液についても灌流流量による影響が有意に現れた．しかし，変化の度合い (v_{w300} / v_{w0}) は，リポ蛋白のみを含んだ灌流液のほうが大きかった．これらの結果は，水透過速度が灌流条件のみに影響されるのではなく，灌流液中に入っている巨大分子の大きさにも依存することを示している．そして，血清においては，主にその中に含まれているリポ蛋白により水透過速度が決定されていることが示唆された．

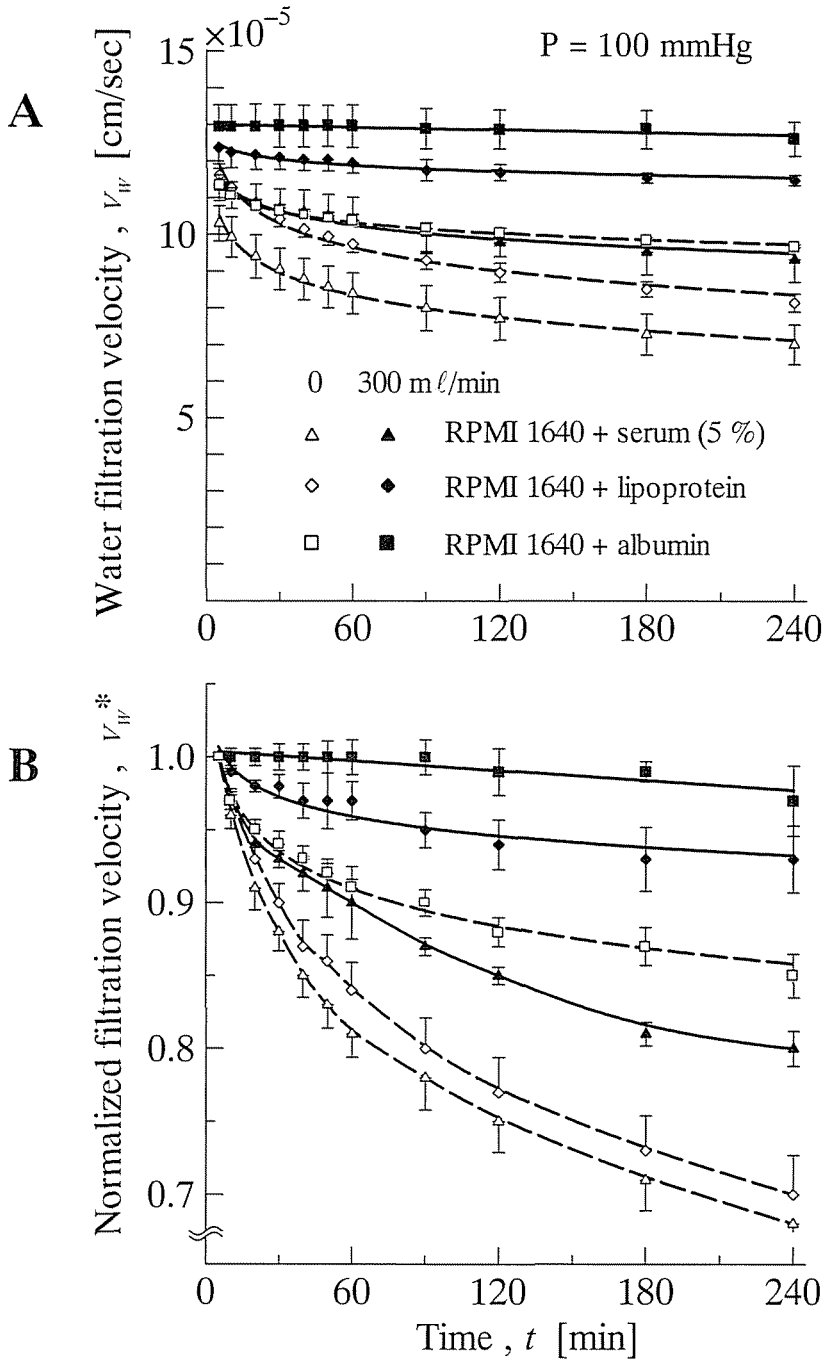

図４-５．リポ蛋白あるいはアルブミンのみを含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度におよぼす壁せん断速度の影響

Time-dependent variations of water filtration velocities (A) and filtration velocities normalized by the values obtained 5 minutes after starting the flow experiment (B). Measurements were carried out with a cell culture medium containing either bovine total plasma lipoproteins (◇, ◆) or bovine albumin (□, ■). The results obtained with a medium containing serum at 5 % by volume (△, ▲) are also plotted for comparison. Empty symbols show the results obtained under non-flowing conditions, and filled symbols the results obtained at a flow rate of 300 mℓ/min. Wall shear stresses calculated for the flow of a cell culture medium containing bovine total plasma lipoproteins and bovine albumin were 1.2 and 2.2, dynes/cm^2, respectively. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 3.

4.3.4. 水透過速度におよぼす灌流流量の影響の可逆性について

図４-６は，灌流流量の変化により水透過速度がどのように変化するかを調べた結果を示している．図から明らかなように，透過を開始してから 250 分後に灌流を開始すると，水透過速度はすぐに増大し，380 分後に灌流を停止すると，その値は元の値まで徐々に減少した．水透過開始後 240 分における水透過速度と 370 分後におけるその値との間には有意な差（$p < 0.005$）があったが，240 分後における値と 500 分後における値の間には有意差はなかった．これらのことから，水透過速度は灌流流量の変化に追従して可逆的に変化することがわかった．

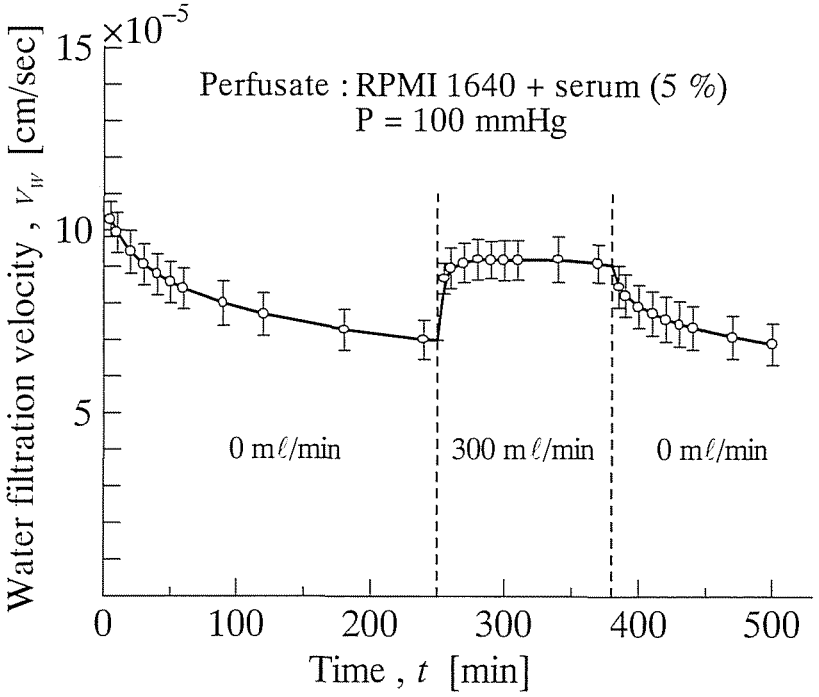

図４-６．水透過速度におよぼす灌流流量の影響の可逆性

Flow rate was changed 250 minutes and 380 minutes after starting the flow experiment. Mean water filtration velocities measured 240, 370, and 500 minutes after starting the flow experiment were 7.01 ± 0.54, 9.10 ± 0.52, and 6.90 ± 0.57 ($\times 10^5$ cm/sec) , respectively. Experimental data are presented as a mean ± SD for n = 3.

4.4. 考察

4.4.1. 透析膜内表面近傍における巨大分子の濃度

本章で行った実験の結果，透析膜チューブの内外の圧力差を約 100 mmHg の一定値に保ったままでも，水透過速度は灌流条件に依存して変化し，流れのない条件下で最も低い値を示すことがわかった．ちなみに，ここで設定したチューブの内外の圧力差条件下での水透過速度は 10^{-5}～10^{-4} cm/sec の範囲の値であり，生体の動脈で得られる値の約 10 倍である．これは動脈系に移植された人工血管における値とほぼ同程度の値である．上記の水透過速度の変化は，灌流液中に巨大分子が含まれていないと起こらないことや，灌流液中の血清濃度と水透過速度との関係（図４-４）から，透析膜の内表面近傍における巨大分子の濃度が灌流条件により変化することによって起こる現象であり，水透過速度の値が流れのない時に最も小さくなるのは巨大分子の壁面濃度が流れのない時に最も大きくなるためであると考えられる．

4.4.2. 流れ（主流）の方向に沿った水透過速度の変化

半透膜の内表面上に形成される巨大分子の濃度境界層は，膜の入り口から出口に向かって発達するので，水透過速度も同様に入口からの距離によって異なり，壁面濃度が最も小さい入口で最も大きく，出口で最も小さくなっていると考えられる．しかしながら，局所的な水透過速度を測定することが不可能なため，本研究では有限の長さの半透膜チューブ全体から透過する液の流量を測定して水透過速度を求めた．したがって，本研究の結果で示したデータは，有限の長さの半透膜チューブ全体の平均値である．それにもかかわらず，生体内で起こり得る範囲の灌流速度の変化により水透過速度が変化するという現象が見られ，血漿蛋白やリポ蛋白の濃縮の度合いが血流条件により大きく影響されることがわかる．

4.4.3. 巨大分子の濃縮現象について

血管壁における水透過速度（水透過率を含む）におよぼす巨大分子の影響については，幾つかの研究グループによる報告がある．Lever and Sharifi (1987) と Tarbell et al. (1988) は，灌流しない状態で家兎総頸動脈における水透過率におよぼす灌流液中の血漿アルブミン濃度の影響を調べ，灌流液中の血漿アルブミン濃度の増大により透過水量（水透過率）が減少することを報告している．透析膜を用いた本研究による結果も彼らの結果と同様であり，流れのない状態でのアルブミンを加えた灌流液の水透過速度は，純粋な培養液の値に比べて 18 %低い値であった (表４-１参照)．イヌ総頸動脈と大腿静脈内に 5 %の血清を含んだ灌流液を流した場合にも水透過速度が低下することが Deng (1991) により報告されている．彼の測定結果は，Lever and Sharifi (1987) と Tarbell et al. (1988) のウサギの動脈を用いてアルブミンを含んだ灌流液を流して得られた結果よりも低い値であった．同様の結果が，半透膜を用いた本研究でも得られ，5 %の血清を含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度は，何も含まない灌流液で得られた値の 60 %の値であり，アルブミンを混入した場合よりも低下していた．Lever and Sharifi (1987) と Tarbell et al. (1988) の研究で用いた灌流液中のアルブミンの濃度 (1～10 g/dℓ) は 5 %の血清を含んだ灌流液中におけるアルブミンの濃度 (約 240 mg/dℓ) よりはるかに大きいにもかかわらず，水透過速度におよぼす影響が小さいという事から，血清中に存在する他の成分がかなり大きな影響をおよぼしていることが考えられる．本研究では，透析膜チューブにおける水透過速度におよぼす血清中に存在するアルブミンとリポ蛋白の影響について個別に調べ，リポ蛋白のみを含んだ灌流液を用いた場合の水透過速度が何も含まない灌流液を用いた場合の水透過速度の 69 %になり，アルブミンのみを含んだ灌流液の場合よりも 5 %の血清を含んだ灌流液で得られる値に近いことを見い出した．

4.4.4. 巨大分子の大きさと濃縮度合いとの関係

本章の実験で灌流液に混入して用いた血漿リポ蛋白は，分子サイズの大きい LDL (20 - 25 nm) の量が血清中より少なく，LDL よりも更に大きい VLDL (30 - 75 nm)

は僅少で，ほとんどがアルブミン(3.6 nm) より少し大きいサイズの HDL (7.5-20nm) であった．それにも係わらずリポ蛋白の混入により水透過速度が大きく変化することから，水透過速度が主に少量ながら分子サイズの大きい LDL によって決定されているか，あるいは灌流液中の巨大分子の大きさの違いに非常に敏感であることがわかる．これに関しては，Colton et al. (1972) が半透膜を用いて LDL や VLDL を混入した溶液の透過性を調べた実験で得た結果からも同様のことが言える．このように半透膜と前章で述べた培養血管内皮細胞単層の水透過性に共通した傾向が見られることから，細胞単層表面でも流れと分子の大きさに応じた巨大分子の濃縮が起こっていて，分子サイズの大きい LDL のような巨大分子ほど濃度が高くなっていると思われる．実際に，Fry et al. (1986) は，内皮を剥離したミニブタ大動脈の内膜表面上における放射性同位体で標識したアルブミンと LDL の濃度を測定し，灌流液中の濃度と比較した結果，それぞれ 15 %および 41 %高い値になっていて，水透過実験により血管の内表面で濃縮が起こっていることを報告している．Smith and Staples (1980) は，ヒト大動脈の内膜内の LDL 濃度が血漿中の濃度の約 2 倍になっていて，アルブミンの濃度は血漿中の濃度の 4 分の 1 しかないことを見出した．また，Curmi et al. (1990) は，家兎胸部大動脈の内膜内に含まれている血漿巨大分子の濃度がその分子の大きさに比例した値になっていることや，灌流圧を高くすると内膜内の LDL の濃度がかなり増えることを報告している．流速依存性濃縮現象が，これらの報告にあるような血管内膜内における血漿巨大分子の濃度の大小を決定している主な要因であると考えられる．

4.4.5. 水透過速度におよぼす灌流の影響についての他の報告例との比較

血管壁の水透過性におよぼす灌流の影響について調べた報告も幾つかある．Caro et al. (1985)は，ウサギの総頸動脈にアルブミンを 1 %あるいは 4 %の割合で含んだクレブス・リンゲル液を流量 0.17 cm^3/sec (10 mℓ/min) で灌流したときと灌流を止めたときの水透過速度を測定し，それらの比が両方の液体ともほぼ 1.30 になり，灌流した場合には水透過速度が大きくなることを報告している．また，前項で触れた Fry et al. (1986) は，内皮を剥離して切り開いたミニブタ大動脈を用いて実験を行

い，血管壁におけるアルブミンと LDL の取り込みと内壁表面上におけるそれらの物質の濃度を測定し，流れ（撹拌）がある場合には両物質の内壁表面上における濃度が減少し，灌流液中の濃度に近くなり，壁内への取り込み量も減少することを見出した．半透膜チューブを用いた本章での結果は，彼らの結果と一致している．

4.4.6. 水透過速度の経時的な減少の要因

本章で行った実験で，巨大分子を混入した灌流液を用いた場合に，透析膜を透過する液体の透過速度が時間とともに変化し，はじめは急激に，そしてその後はゆっくりと減少する傾向が見られた．これは，時間とともに濃度境界層が発達することや，血清中の種々の蛋白分子の膜面への吸着により水の透過経路が徐々に狭められることによって液体が膜を透過するときの抵抗が時間とともに増大することによると思われる．これらの 2 つの要因を各測定時刻において完全に分離し，濃縮の影響だけを正確に調べることはできないが，図４-６から 250 分間に起こった蛋白の吸着と濃縮のそれぞれの影響を分離して比較することができる．灌流を止めていた 250 分間に蛋白の濃縮と膜面への吸着により起こった水透過速度の変化量は，240 分の時の値 (7.01×10^{-5} cm/sec)より実験開始後 5 分時における値 (10.30×10^{-5} cm/sec) を差し引いた値，すなわち-3.29×10^{-5} cm/sec である．そのうち巨大分子の濃縮による水透過速度の変化量は，240 分の時の値から，灌流によって濃度境界層が薄くなった時の値，すなわち 250 分以降で最大値を示した 280 分の時の値 (9.21×10^{-5} cm/sec)を差し引いた量，すなわち-2.20×10^{-5} cm/sec である．これは全変化量の 67 %であり，残りの 33 %が蛋白の膜面への吸着による変化量と見なすことができる．以上の結果から，濃度境界層の発達と同時に蛋白の吸着が起こり，水透過速度が時間の経過と共に減少することがわかる．

4.4.7. 培養血管内皮細胞を用いた場合の実験結果との比較

本章の結果は，培養血管内皮細胞単層における灌流流速に依存した水透過速度の変化が，内皮細胞単層表面上においてリポ蛋白が濃縮されるという物理的な現象に

よるものであることを示している．つまり，細胞内小胞による物質輸送能力の変化によって起こる水透過速度の変化よりも巨大分子，特にリポ蛋白の流速依存性濃縮現象によって起こる水透過速度の変化の方が支配的であることを示している．

4.5. 結言

本章では，血管壁のモデルとして透析膜を用い，その膜面における水分の透過速度を幾つかの条件下で測定し，水透過速度におよぼす諸因子の影響について検討を行った．そのた結果以下のことがらが明らかになった．

1) 血清や血漿中に含まれている巨大分子を混濁した培養液を用いて実験を行った場合には時間の経過に伴って水透過速度が徐々に低下する．
2) 培養液中における血清の濃度が高いほど水透過速度は小さい値を示す．
3) 血清を含んだ培養液では，灌流しない時の方が灌流した時より水透過速度は小さい値を示す．
4) (3)の現象にはアルブミンよりリポ蛋白の方が大きな影響をおよぼす．
5) (3)の現象は流量（流速）の増減により可逆的に起こる．

以上の結果を総合して考察し，次のような結論を得た．

1. 水は通すが血漿蛋白などの巨大分子は通しにくいといった半透性を有する管壁を持った管内を血清または血漿蛋白を含んだ液体が層流状態で流れている場合には，培養血管内皮細胞単層で見られたのと同様に，管壁内表面上で流速に依存した巨大分子の濃縮現象が起こる．
2. 培養血管内皮細胞単層で見られた灌流速度（流量）に依存した水透過速度の変化は，半透性を有する内皮細胞単層の濾過作用により細胞単層表面上でリポ蛋白の濃縮が起こり，その濃縮の度合いが流速の増減に追従して可逆的に変化するという単なる物理的現象によって引き起こされたものである．

本章における実験により，Karino et al. (1990, 1993, 1995a)，Deng et al. (1995b)，および Wada and Karino (1999)によるコンピュータ・シミュレーションにより見出された血管内壁表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象が，実験的にも生理的範囲内の流れおよび水透過速度の条件下で起こることが確かめられた．これによ

り，この現象が動脈硬化症や内膜肥厚の局所的な発症および進展を引き起こす要因になっていることが強く示唆された．

参考文献

CARO, C.G., LEVER, M.J., and TARBELL, J.M. (1985). Effect of luminal flow rate on transmural fluid flux in the perfused rabbit common carotid artery. In: *Proc. Physiol. Soc.* (March), 92P.

COLTON, C.K., FRIEDMAN, S., WILSON, D.E., and LEES, R.S. (1972). Ultrafiltration of lipoproteins through a synthetic membrane. *J. Clin. Invest.* **51**, 2472-2481.

CURMI, P.A., JUAN, L., and TEDGUI, A. (1990). Effect of transmural pressure on low density lipoprotein and albumin transport and distribution across the intact arterial wall. *Circ. Res.* **66**, 1692-1702.

DENG, X.-Y., MAROIS, Y., HOW, T., MERHI, Y., KING, M., GUIDOIN, R., and KARINO, T. (1995b). Luminal surface concentration of lipoprotein (LDL) and its effect on the wall uptake of cholesterol by canine carotid arteries. *J. Vasc. Surg.* **21**, 135-145 and **22**, 9A and 648.

FRY, D.L., CORNHILL, F., SHARMA, H., PAP, J.M., and MITSCHELEN, J. (1986). Uptake of low density lipoprotein, albumin, and water by deendothelialized in vitro minipig aorta. *Arteriosclerosis* **6**, 475-490.

KARINO, T., and DENG, X. (1990). Lipoprotein concentration at the blood-endothelium boundary and its implications for the pathogenesis of vascular diseases. *J. Japanese College of Angiology* **30**: 710.

KARINO, T., and DENG, X. (1993). A hypothesis for the pathogenesis of atherosclerosis: Flow-dependent concentration polarization of lipoproteins at the blood-endothelium boundary. In: *Proc. Jikei University Medical School Symposium on Hemorheological Study on Microcirculatory Disturbances and Dysfunction of Vascular Endothelial Cells.* Y. ISOGAI Ed. Medical Review Inc., Tokyo: pp. 35-42.

KARINO, T., DENG, X., and NAIKI, T. (1995a). Flow-dependent concentration polarization of lipoproteins at the blood-endothelium boundary. *ASME BED* **29**: 13-14.

LEVER, M.J., and SHARIFI, N. (1987). The effects of transmural pressure and perfusate albumin concentration on the hydraulic conductivity of the isolated rabbit common carotid artery. In: *Proc. Physiol. Soc.* (January), 68P.

NAIKI, T., SUGIYAMA, H., TASHIRO, R., and KARINO, T. (1999). Flow-dependent concentration polarization of plasma proteins at the surface of a cultured endothelial cell monolayer. *Biorheology*

TARBELL, J.M., LEVER, M.J., and CARO, C.G. (1988). The effect of varying albumin concentration of the hydraulic conductivity of the rabbit common carotid artery. *Microvasc. Res.* **35**, 204-220.

WADA, S., and KARINO, T. (1999). Theoretical study on flow-dependent concentration polarization of low density lipoproteins at the luminal surface of a straight artery. *Biorheology* **36**, 207-223.

第5章 蛍光強度測定による巨大分子の流速依存性濃縮現象の解析

5.1. 緒言

動脈硬化症の局所的発症にリポ蛋白の流速依存性濃縮現象が関与しているという考えから，その現象が生理的条件下で起こることを第３章と第４章では血管のモデルとしてそれぞれ内皮細胞単層および透析用チューブを用い，その管壁における水透過速度を測定することにより実証することを試みた．しかし，この方法では血管壁近傍のリポ蛋白の濃度を間接的に推測することしかできなかった．先に２．６において，半透性膜近傍における巨大分子の濃度の測定に使用できると思われる方法を幾つかリストアップした際に，現時点において利用可能な方法として水透過速度測定法と顕微共焦点蛍光分光法の２つがあることを述べた．そのうちの一つである顕微共焦点蛍光分光法は，分解能および感度に関しては水透過速度測定法に劣ると考えられるが，巨大分子の濃度を直接測定できる方法である．そこで，本章では巨大分子の濃度を直接測定する手段として，共焦点法ではないが，顕微蛍光法を採用することにした．具体的には，培養したウシ大動脈の内皮細胞単層を血管のモデルとして用い，リポ蛋白と同じサイズの，蛍光物質により標識したポリスチレン微粒子を巨大分子のモデルとして用い，その濃度を直接測定することにより，流れと灌流圧の影響を調べることを試みた．なお，本章で用いた方法は共焦点法ではないため，流路内の励起光が通過する全領域における灌流液の蛍光強度の総和を測定することになり，空間分解能は共焦点法よりも悪い．そのため，その測定精度について特に注意深く考察した．しかし，その欠点とは裏腹に，この方法では焦点位置を厳密に合わせる必要がないので，共焦点法よりも簡便に測定を行うことができるという利点がある．

5.2. 試料および方法

5.2.1. 試料，灌流装置，蛍光微粒子および灌流液

血管内皮のモデルとしてウシ大動脈由来培養内皮細胞を Millicell-CM culture Insert の底面の外側に播種，培養した試料を使用した．細胞の培養，培養血管内皮細胞単層の作製法は，第３章に記した方法と同じである．

灌流液としては第３章の実験で用いたのと同じウシ胎児血清と抗生物質を含んだ細胞培養液を用い，これにリポ蛋白分子のモデル並びにトレーサとして直径 20 nm の蛍光ポリスチレン微粒子 (FluoSpheres® L-5002, Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) を 4×10^{13} 個/mℓ（固形率 0.015 %）の濃度になるように懸濁した．

図５-１は実験に用いた定常流灌流装置の概略を示している．これは第３章の実験で使用したものとほとんど同じ装置であるが，一部改良し平行平板型流路を上下逆に設置し，細胞単層とその上を流れる灌流液を顕微鏡で観察できるようにした．また，平行平板の一部に厚さ 1.0 mm のスライドガラス製の観察用の窓を設けた．それに伴い，水透過速度を測定するためのメスピペットをチューブを介して装置に取り付けた．また，恒温水槽を空気灌流式に変更し，ヒータと温度調節機により温度を一定に保つようにした．その他，図には示していないが，50 mℓ/min 以上の流量を測定するための流量計 (DU-5TGS-1FV, Stec) とそれ以下の微少流量を測定するための流量計 (LF-510, Stec) を流路に並列に取り付け，適宜切り替えて流量を測定できるようにした．灌流装置の灌流液にふれる部分は，全て，オートクレーブによる滅菌，あるいはホルマリンガス（エフゲン，エフゲン株式会社）による殺菌を施した．

5.2.2. 蛍光強度測定装置

直径約 2 mm の円形領域内の細胞単層を倍率 4×の対物レンズを用いて落射蛍光顕微鏡 (Microphoto-FX, Nikon) で観察し，そこにおける蛍光微粒子の蛍光強度を顕微測光装置 (P1, Nikon) で測定した．顕微測光装置は，光を電流に変換するフォトマルチプライアと，それに印加する電圧を調節し出力電流を表示するフォトメータからなっている．光源には 100 W 水銀ランプを用いた．蛍光の観測には，波長 546

nm の励起光を照射する励起フィルタ (EX546/10, Nikon) と波長 590 nm 以上の散乱光を透過する吸収フィルタ (BA590, Nikon), 波長 580 nm 以下の光を反射するダイクロック・ミラー (DM580, Nikon) からなる落射蛍光用フィルタセット (G-1B, Nikon) を用いた．また，必要に応じ，励起光を 1/2 に減光する減光フィルタ (ND2) または 1/16 に減光する減光フィルタ (ND16) を用いた．蛍光強度の測定実験は，外部光量変化の影響をなくすため，暗室の中で行った．

実験終了前後の細胞単層の観察には，倒立型落射蛍光顕微鏡 (Diaphot TMD300, Nikon) を用い，細胞の状態を 35 mm カメラ (F-601, Nikon) で撮影した．

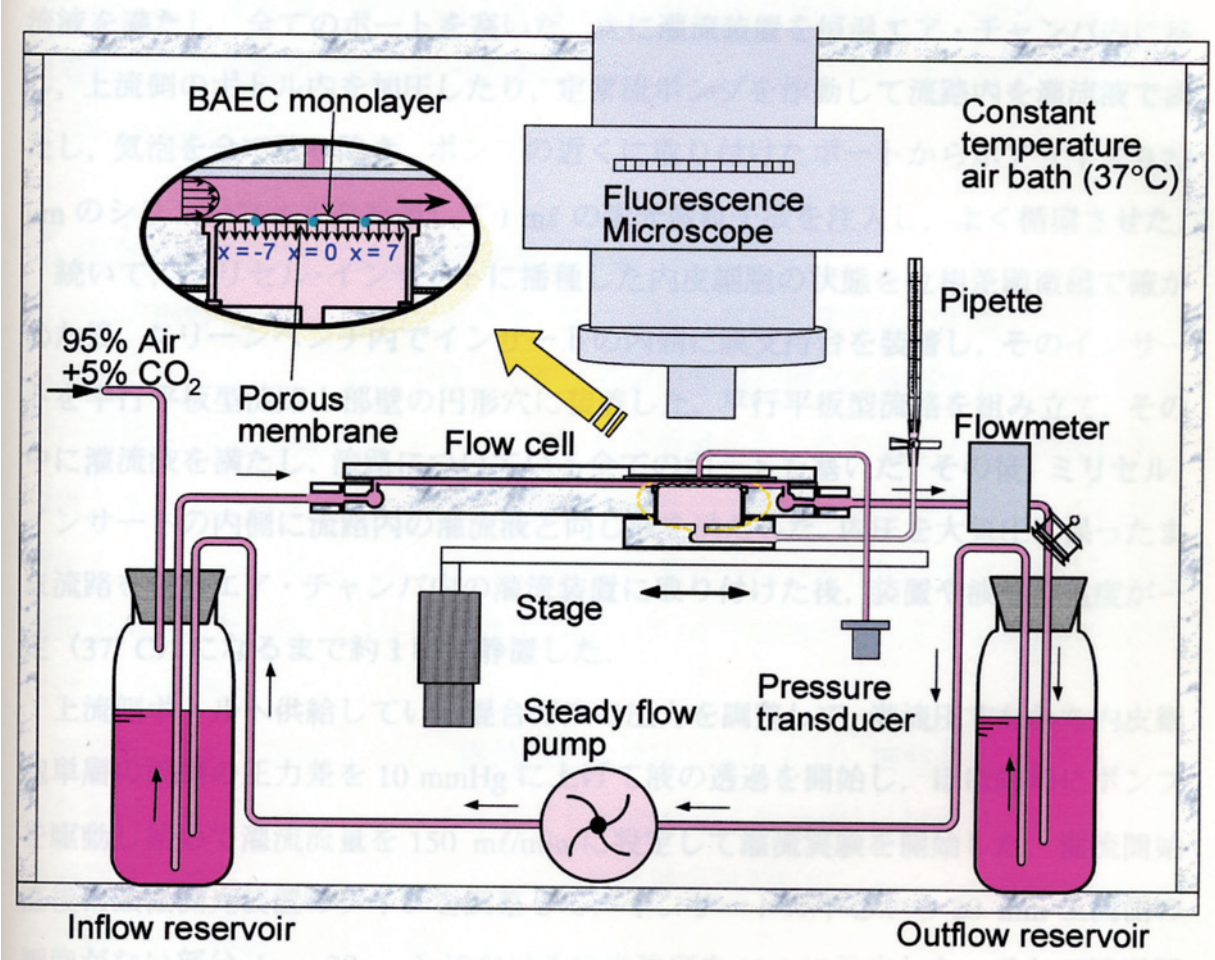

図５-１．灌流装置の模式図

BAECs were cultured in a monolayer on a porous membrane, and installed in an Plexiglass parallel plate flow cell having a height of 0.5 mm. The apparent concentration of serum on the surface of a BAEC monolayer (apparent surface concentration) was estimated from the water filtration velocity measured with a graduated pipette.

5.2.3. 実験方法および実験データの解析方法

(a) 流速の影響について検討する実験の場合

灌流実験の前準備として，灌流実験装置の各パーツは，ホルマリンガス中に入れ殺菌した後クリーンベンチの中に移し，24 時間以上放置し，吸着したホルマリンガスを散逸させた．また，恒温エア・チャンバについても，24 時間以上前に組み立て，内部を 70 %エタノール水溶液を用いて殺菌し，温度を 37°C に設定しておいた．灌流液に関しては，液温を実験温度と同じ 37°C にし，pH を 7.4 位にするため，あらかじめ CO_2 インキュベータ内に 24 時間以上入れておいた．

実験当日はまず，平行平板型流路の代わりにチューブコネクタを用い，平行平板型流路を除く灌流装置をクリーンベンチ内で組み立て，上流側ボトルに 90 mℓ の灌流液を満たし，全てのポートを塞いだ．次に灌流装置を恒温エア・チャンバ内に移し，上流側のボトル内を加圧したり，定常流ポンプを作動して流路内を灌流液で満たし，気泡を全て取り除き，ポンプの近くに取り付けたポートからポアサイズ 0.22 μm のシリンジフィルタを通して 1 mℓ の蛍光微粒子液を注入し，よく循環させた．

続いて，ミリセル･インサートに播種した内皮細胞の状態を位相差顕微鏡で確かめた後，クリーンベンチ内でインサートの内側に膜支持台を装着し，そのインサートを平行平板型流路上部壁の円形穴に装着した．平行平板型流路を組み立て，その中に灌流液を満たし，流路についている全てのポートを塞いだ．その後，ミリセル･インサートの内側に流路内の灌流液と同じ液を満たした．内圧を大気圧に保ったまま流路を恒温エア・チャンバ内の灌流装置に取り付けた後，装置や液体の温度が一定（37° C）になるまで約 1 時間静置した．

上流側ボトルへ供給している混合ガスの圧力を調整して，灌流圧すなわち内皮細胞単層の両側の圧力差を 10 mmHg に上げて液の透過を開始し，ほぼ同時にポンプを駆動し始めて灌流流量を 150 mℓ/min に設定して灌流実験を開始した．灌流開始直後に顕微測光装置のゲインを調整して，インサートの中心から 20 mm 上流側の細胞がない部分 (x = -20 mm) における蛍光強度を 10.0 に設定した．そして透過開始 5，10，20，27 分後に以下に記す一連の測定を行った．まず，x = -20 mm での蛍光強度を測定し，順次下流方向へ測定点をずらしていき，インサートの中心から 7

mm 上流（x = -7 mm），インサートの中心（x = 0 mm），7 mm 下流（x = 7 mm）における細胞層上の灌流液の蛍光強度を測定した．なお，光路シャッターを使い，励起光の灌流液への照射は蛍光強度を測定するときにのみ行い，蛍光粒子が励起光に曝される時間をできるだけ少なくした．次に，細胞単層から透過する液の透過速度（v_w）をメスピペット内の液面が一定容量分上昇するのにかかる時間を計測して求めた．

透過開始から 30 分経過した後に，流量を 50 mℓ/min に変化させて，同様の測定を行った．その後流量を 10, 0, 10, 50, 150 mℓ/min と変化させて同様に測定したが，流量 0 mℓ/min の時だけは 60 分間測定することにした．

全ての灌流液について水透過速度を測定した後，平行平板型流路からミリセル・インサートを注意深く取り出し，細胞単層の状態を位相差顕微鏡で観察した．細胞単層の状態が実験開始前と比べて変わってしまった場合には，その細胞を用いて得たデータを全て破棄した．

(b) 圧力の影響について検討する実験の場合

流速の影響を調べる実験をした後，幾つかは引き続き灌流圧の影響について調べる実験に用いた．この実験では，まず，流速の影響を調べる実験を終了した後，直ぐに流量を 10 mℓ/min に設定し，1 時間程度放置した．その後に上記と同様に蛍光強度と水透過速度を測定し，さらにその 3 分後にも同様の測定を行った．その後灌流圧を 20, 10, 30, 10, 50, 10, 100, 10 mmHg と変化させ，5 分毎に蛍光強度と水透過速度を測定した．10 mmHg の灌流圧の時には 10 分間測定し，その他の灌流圧の時には 20 分間測定した．

測定終了後に，灌流を止め，灌流圧を大気圧に戻した後，細胞を傷つけないように気を付けながらインサートを平行平板型流路から取り出し，細胞層の状態を位相差顕微鏡で観察した．取り出した時点で細胞層が剥がれていることが確認された場合には，その細胞を用いて得たデータを全て破棄した．

(c) 実験データの解析方法

細胞で覆われている部位で測定した蛍光強度については，全て，同時に測定した細胞で覆われていない上流側 (x = -20 mm) での蛍光強度の測定値で正規化した．そして実験は全て，同じ条件，手順で，毎回新たな細胞単層を用いて，３回以上行った．主に蛍光強度の変化に着目し，統計的に処理するために，異なった細胞単層間の標本差をできるだけ除き，同じ条件下におけるデータを平均して，全ての時間における蛍光強度を最初の灌流条件下における蛍光強度の最終値（流速の影響を調べる実験では実験開始 30 分時における値）で正規化した．その結果は平均値で表し，必要な場合には平均値と標準偏差で表した．

圧力の影響を調べる実験では，データを全て一番初めの 10 mmHg における蛍光強度の値で正規化し，３回の実験によるデータの平均値を求めた．

２つの平均値間の有意差の有無の判別は，両端 t 検定を用いて行った．

5.3. 実験結果

5.3.1. 巨大分子の壁近傍濃度におよぼす灌流圧の影響

図５-２は，血清を体積濃度で 20 %の割合で含んだ培養液を用い，灌流流量を 10 mℓ/min に設定し，流量を一定に保ったまま灌流圧のみを変化させたときの蛍光強度の変化を示している．灌流圧を増加すると蛍光強度はそれに応じて増加し，10 mmHg に戻すと低下した．また，灌流圧を 20, 30, 50, 100 mmHg と変化させた場合でも蛍光強度は，設定した圧力にほぼ比例して増大した．一方，灌流圧を 10 mmHg に戻したときの蛍光強度の値も灌流圧の増大とともに上昇した．

背景の明るさがほぼ等しい x = -7 と x = 7 mm の部位における蛍光強度の値を比較すると，上流側の x = -7 mm の方が小さかった．その違いは，灌流圧を高くするほど顕著に現れた．また，10 mmHg に戻したときの蛍光強度の値も高圧にするほ

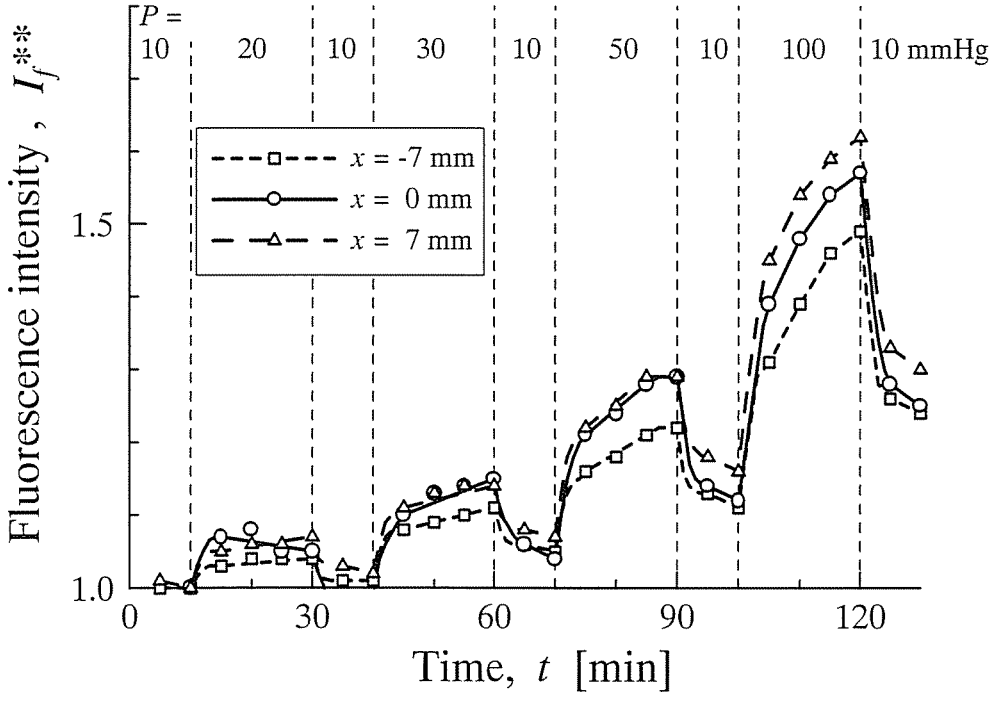

図５-２．蛍光強度におよぼす圧力の影響

Time-dependent variations of fluorescence intensity normalized by the values obtained 10 minutes after starting the flow experiment. Wall shear rate was set to 100 sec^{-1}. Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Empty rectangle, circle, and triangle show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively. Experimental data are presented as a mean for n = 3.

ど，下流側の方が大きくなっていた．

5.3.2. 巨大分子の壁近傍濃度におよぼす流速の影響

実験は，血清を全く含んでいない培養液，血清を 20 %の体積割合で加えた培養液，そして血清それ自体の３種類の灌流液を用いて行った．以下にそれぞれの灌流液を用いて得られた結果を示す．

(a) 血清を 20 %の割合で含んでいる灌流液を用いた場合

図５-３は培養液に血清を 20%の体積割合で加えた灌流液を用いた場合の細胞単層上３カ所における蛍光強度の平均値の壁せん断速度による変化を示している．上図，A は細胞のない部位における蛍光強度で正規化して表したデータ，下図，B はそのデータをさらに蛍光強度の変化がはっきりと見えるように実験開始後 30 分時の値で正規化して表してある．30 分時の値で規準化した理由としては，背景の明るさが，測定した３カ所で異なっていたため，その違いによる影響を極力小さくするという意図もあった．始めは 150 mℓ/min の流量で灌流し，実験開始後 30, 60, 90, 150, 180, 210 分時に流量をそれぞれ 50,10, 0, 10, 50, 150 mℓ/min に変えた．使用した灌流液の 37° C における粘度は，せん断速度が 384.0 sec^{-1} の時に 0.7 cP であった．細胞の表面でのせん断速度は 150, 50, 10 mℓ/min の流量で灌流した場合，それぞれ 1500, 500, 100 sec^{-1} となるので，細胞に加わるせん断応力の値はそれぞれ 10.5, 3.5, 0.7 $dynes/cm^2$ という値になる．

細胞のない部位（x = 20 mm）における蛍光強度は全ての実験でほとんど変化しなかった．一方，細胞のある部位では，灌流液の透過を開始すると，蛍光強度は増大し， 30 分でほぼ安定した一定値に達した．そして，流量を 50, 10 mℓ/min と下げると，その都度蛍光強度は僅かに増大し，流れを止めると急激に増大し，60 分後でも安定した一定値に達しなかった．この時に，背景の明るさがほぼ同じ x = -7 mm と x = 7 mm の部位における蛍光強度を比較すると，圧力の影響を調べた実験の結果と同様に，上流側の方が下流側よりも低かった．灌流を再開すると蛍光強度は一気に減少し，ほぼ元の値近くまで戻り，場合によっては元の値以下になることもあった．その後，さらに流量を増大しても蛍光強度はほとんど変化しなかった．

流量がもっと小さい 100, 5, 1, 0 mℓ/min の場合についても同様の実験を行い，蛍光強度の変化を調べた．その結果，図５-４ に示したように，蛍光強度の変化は流量が大きい場合に得られた結果とほとんど同じであった．しかし，流量の増減による蛍光強度の変化は図５-３の場合よりも顕著に現れ，蛍光強度が流速に依存していることがわかった．この流速に依存した変化は，流量を段階的に増大した時にはっきりと現れた．

図５-５ は，実験終了後に内皮細胞単層を位相差顕微鏡と蛍光顕微鏡下で撮影した写真の一例である．この写真から蛍光微粒子が主に細胞と細胞の結合部とその間隙を透過して細胞の下側の多孔質膜との間に蓄積されていることがわかった．このような巨大分子が透過できる間隙は open junction（緩い間隙）と呼ばれている．一般的にはリポ蛋白以上の大きさの物質は細胞の小胞輸送（endocytosis）により内皮細胞単層を透過すると言われているが，この写真では蛍光微粒子が細胞の小胞に取り込まれている様子は観察できなかった．しかし，これは使用したカメラの最長シャッタースピードが 30 秒と限られているため，ほとんどの試料では暗すぎて，蛍光微粒子が良く撮影されていないことによる可能性もある．

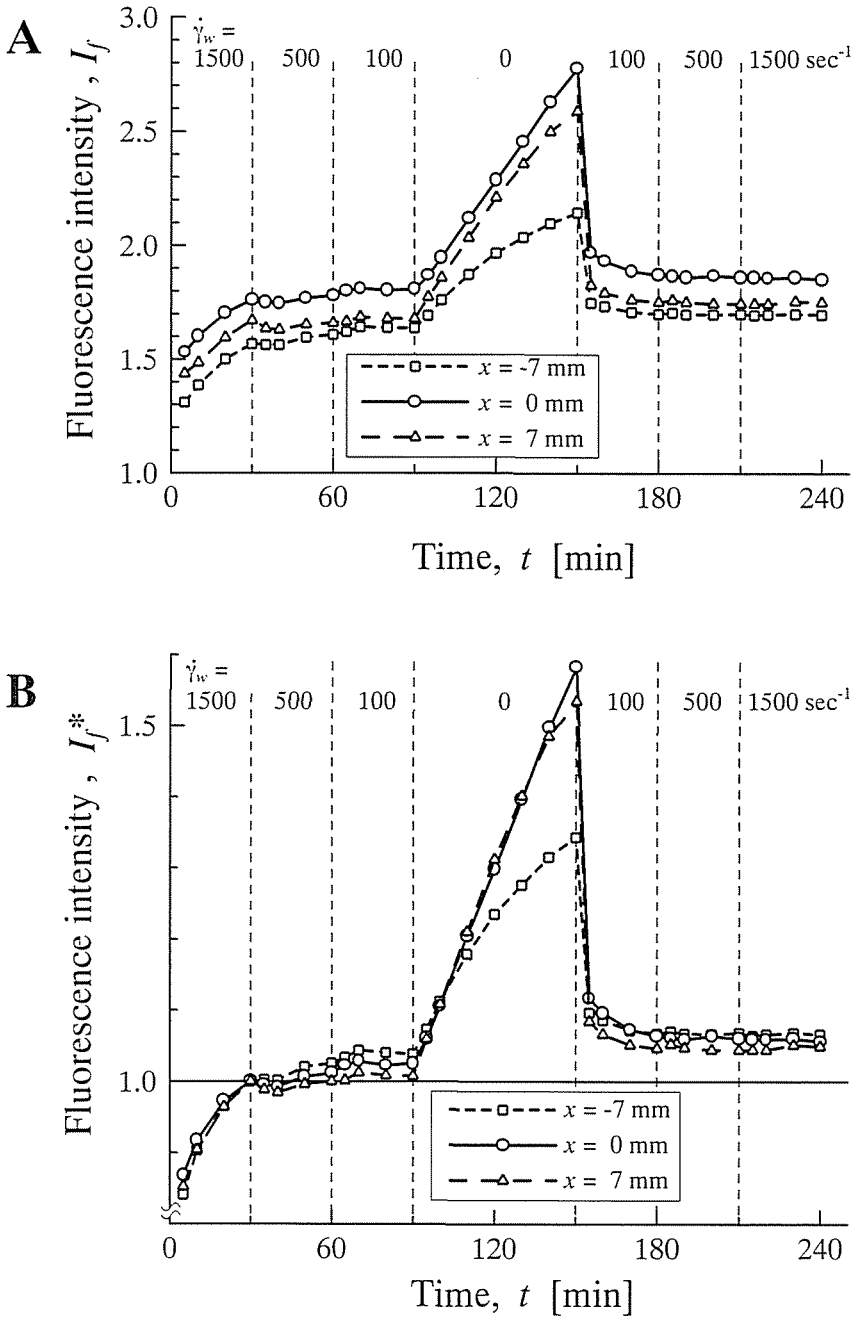

図５-３．蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響

Time-dependent variations of fluorescence intensity (A) and fluorescence intensity normalized by the values obtained 30 minutes after starting the flow experiment (B). Pressure difference across BAEC monolayer was set to 10 mmHg. Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Empty rectangle, circle, and triangle show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively. Experimental data are presented as a mean for n = 6.

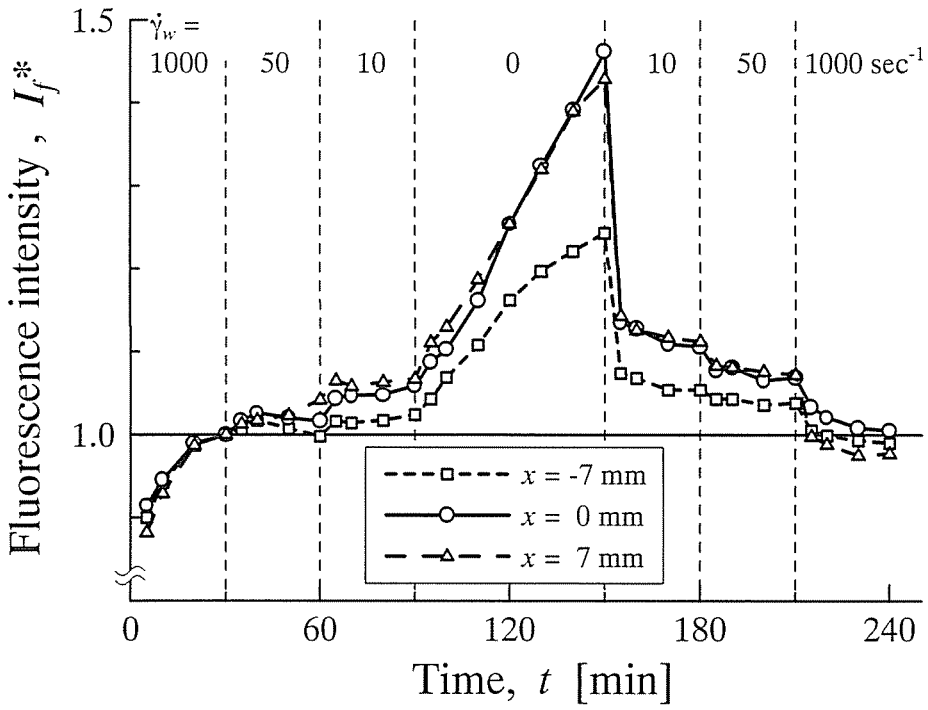

図５-４．蛍光強度におよぼす低壁せん断速度の影響

Time-dependent variations of fluorescence intensity normalized by the values obtained 30 minutes after starting the flow experiment. Pressure difference across BAEC monolayer was set to 10 mmHg. Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Empty rectangle, circle, and triangle show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively. Experimental data are presented as a mean for n = 3.

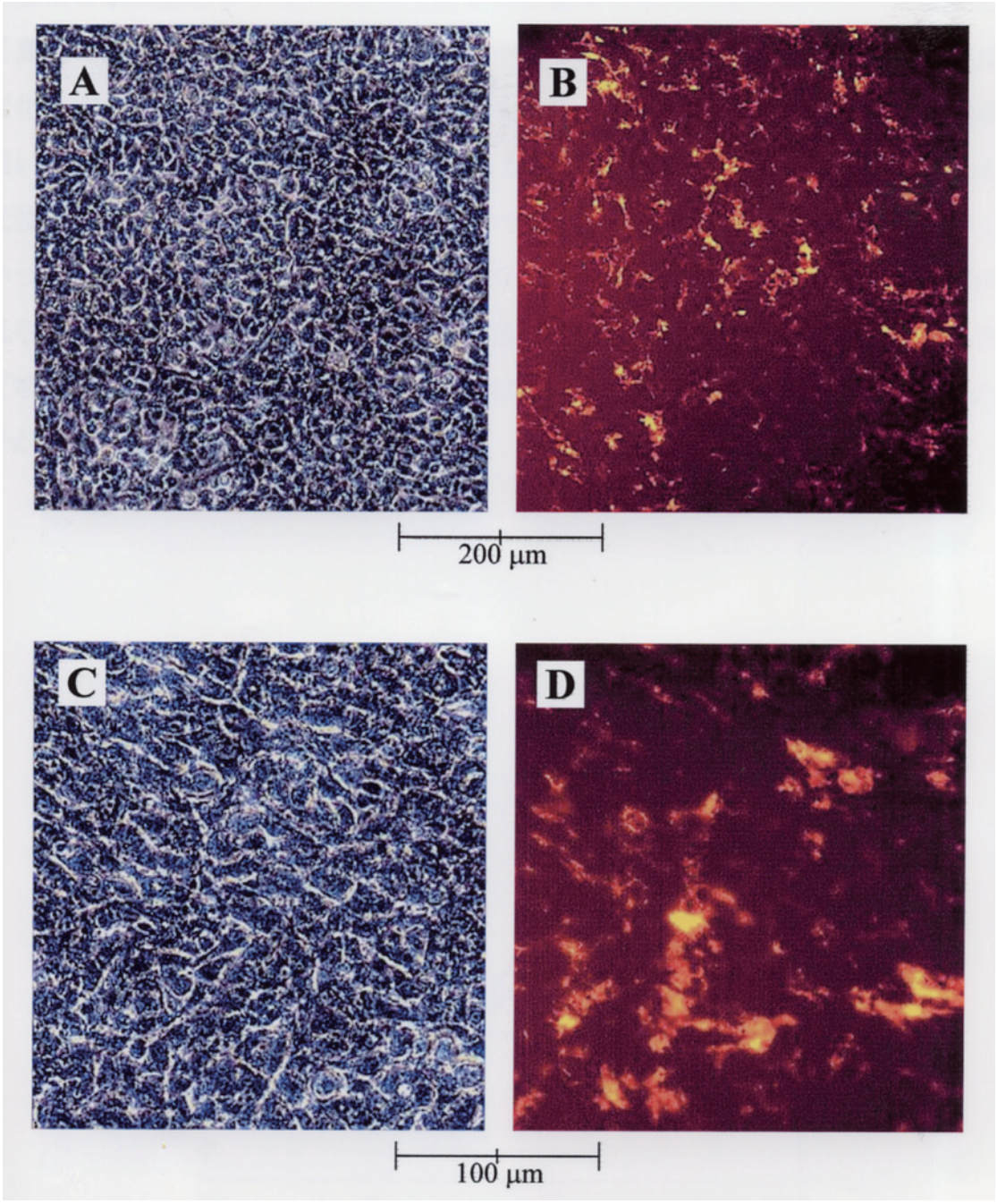

図５-５．体積濃度 20 %の血清を含んだ灌流液を用いて実験した後の内皮細胞単層の蛍光顕微鏡写真

Photographs of a BAEC monolayer used for flow experiment observed by phase contrast microscope and fluorescent microscope. Upper photographs were observed with 20× objective lens, and lower ones with 40× lens.

(b) 血清それ自体を用いた場合

血清を灌流液として用い，その中に20%の血清を含んだ灌流液を用いた場合と同じ濃度の蛍光微粒子を懸濁させ，灌流液中のリポ蛋白濃度が高い場合の蛍光強度の変化を調べた．その結果，図５-６ に示したように，20%の血清を含んだ培養液を用いた場合と同様の結果が得られた．しかし，下流側の部位(x = 7 mm)における蛍光強度が灌流を止めた時にそれほど上昇せず，x = -7 mm における値との差が小さかった．また，全体的に右下がり，つまり時間とともに蛍光強度が減少する傾向が見られた．図５-７は，実験終了後の細胞単層の写真であるが，20%の血清を含んだ培養液を用いた場合と同様に，蛍光微粒子が細胞接合部の緩い間隙を透過した様子が観察された．

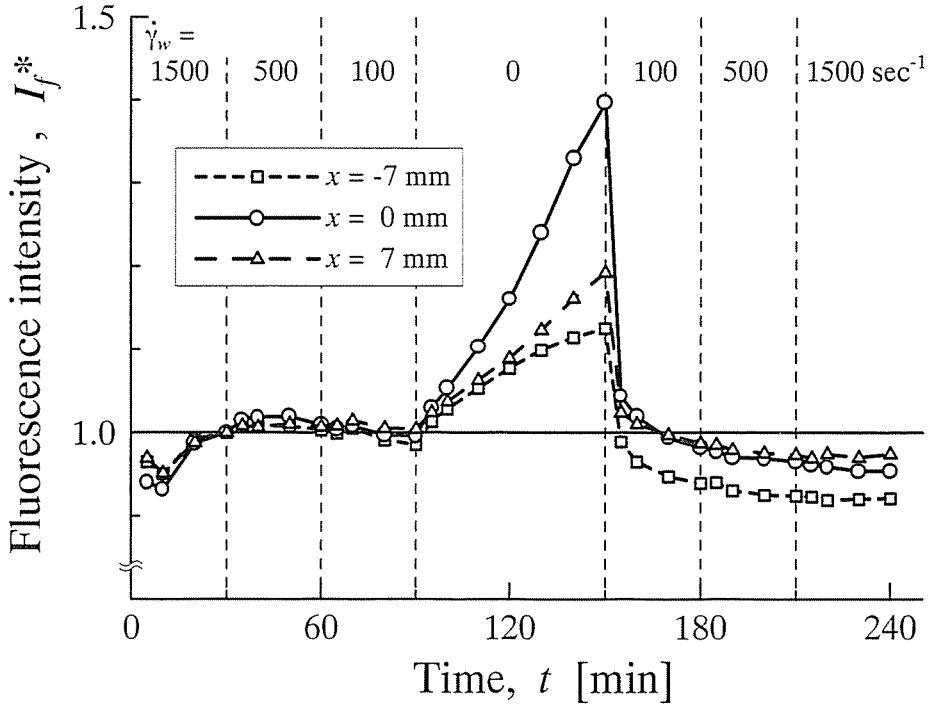

図５-６．血清を灌流液として用いた場合の蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響

Time-dependent variations of fluorescence intensity normalized by the values obtained 30 minutes after starting the flow experiment. Pressure difference across BAEC monolayer was set to 10 mmHg. Measurements were carried out with serum as a perfusate. Empty

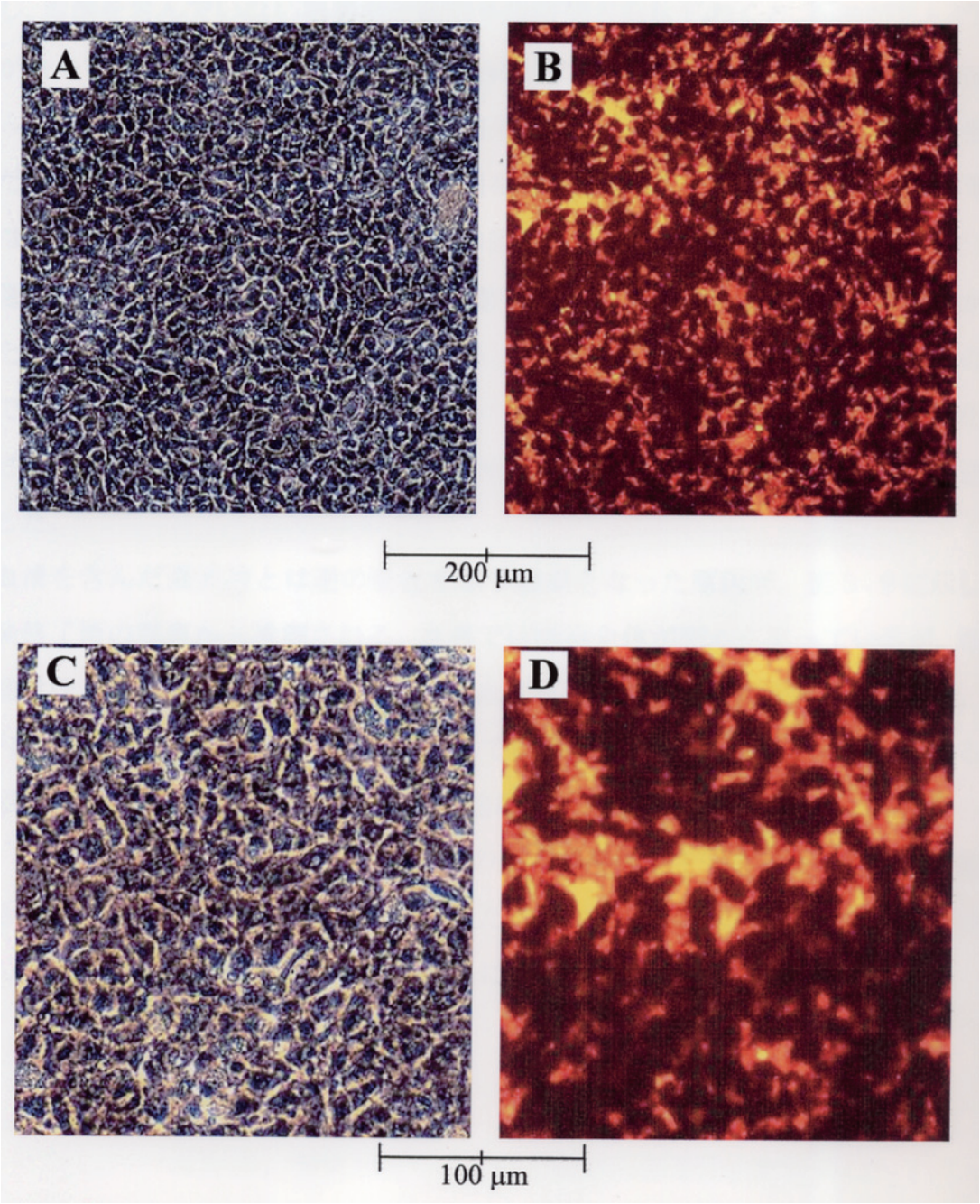

図５-７．血清を灌流液として用いて実験した後の内皮細胞単層の蛍光顕微鏡写真

Photographs of a BAEC monolayer used for flow experiment observed by phase contrast microscope and fluorescent microscope. Upper photographs were observed with 20× objective lens, and lower ones with 40× lens.

(c) 血清を全く含んでいない培養液を用いた場合

血清を全く含んでいない培養液を灌流液として用いても同様の実験を試みた．ただし，血清を含んでいない培養液に細胞を長時間さらしておくと，細胞が死んだり，はがれやすくなるため，２時間で実験を終了することにし，流量も 50 と 0 mℓ/min のみについて調べることにした．その結果は図５-８A に示したように，血清を含んだ灌流液の場合とは全く異なった傾向を示した．図から明らかなように，蛍光強度は単調に直線的に増加し，流量変化の影響はほとんど見られなかった．ただし，流量を０から 50 mℓ/min に変えたときに若干蛍光強度の変化が大きくなる傾向があった．この傾向は４回の実験の結果を示した図５-８B でも明白である．４回の実験で得られた測定値の間の差は大きかったが，再灌流したときに蛍光強度の変化が大きくなる傾向は同じであった．この結果は，血清を含んだ灌流液の場合とは逆であった．

血清を含んだ灌流液とは逆の変化を示す結果となった原因が，図５-９に示した実験終了後の写真から推測される．写真では細胞全体が明るく光っているが，細胞間隙はほとんど光っていない．これは，血清を含んでいない灌流液の場合には，細胞内小胞に蛍光微粒子が多く取り込まれていることを示している．図５-５ あるいは図５-７と比較すると蛍光微粒子の透過経路が全く異なっていることが考えられる．すなわち，この実験から，灌流液中の血清濃度を小さくすると細胞内小胞輸送が活発になるということが明らかになった．そして，そのような状態では，細胞にせん断応力を負荷すると小胞輸送がさらに活発になることがわかった．

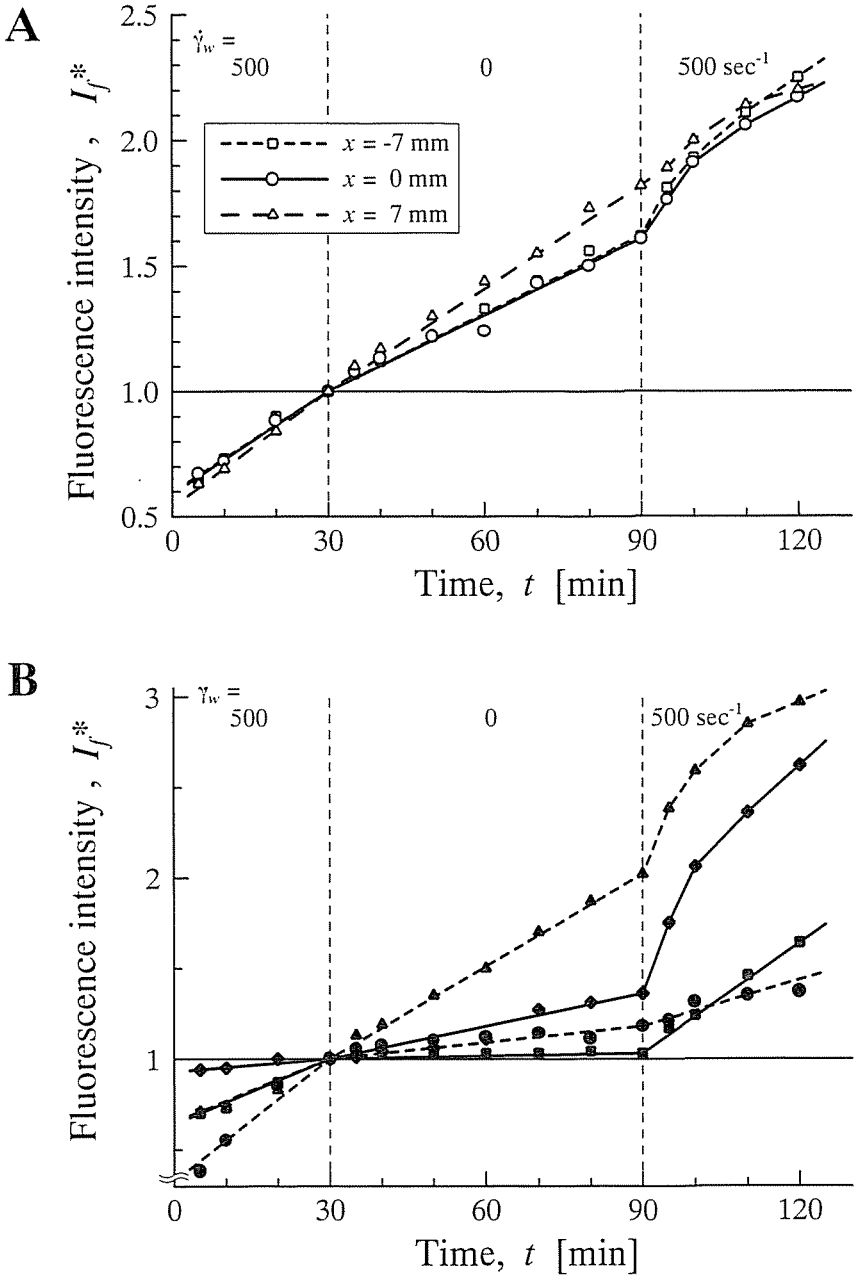

図５-８．蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響

Time-dependent variations of fluorescence intensity normalized by the values obtained 30 minutes after starting the flow experiment. Upper graph is showing a mean value for n = 4 (A) and lower graph is individual data (B). Pressure difference across BAEC monolayer was set to 10 mmHg. Measurements were carried out with a cell culture medium not containing serum. Empty rectangle, circle, and triangle in (A) show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively.

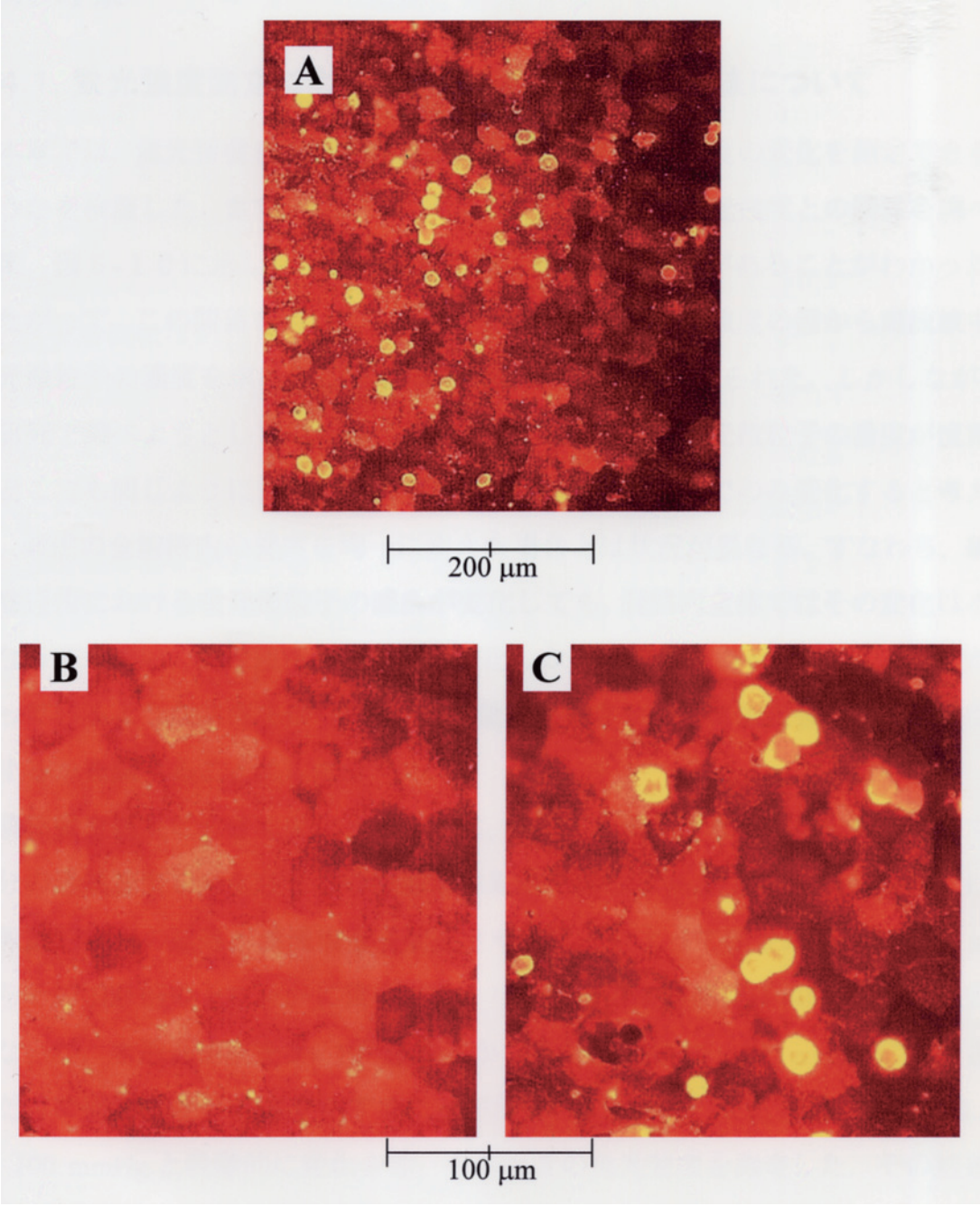

図５-９．血清を含んでいない灌流液を用いて実験した後の内皮細胞単層の蛍光顕微鏡写真

Photographs of a BAEC monolayer used for flow experiment observed by fluorescent microscope. Upper photographs were observed with 20× objective lens, and lower ones with 40× lens.

5.4. 考察

5.4.1. 蛍光強度測定により微粒子の濃度を求める方法について

本章では，蛍光強度を測定する方法により，微粒子の濃度の変化を測定できるかどうかを検証した．まず，溶液中の蛍光微粒子の濃度と蛍光強度との関係を調べた結果，図５-１０に示したように両者の間に強い相関関係があることがわかった，したがって，この関係を用いて，測定により得られた蛍光強度の値から灌流液中の蛍光微粒子の濃度を求めることが可能であることが確かめられた．しかしながら，本研究で調べようとしている濃縮現象では，灌流液中の蛍光微粒子の濃度が流路内のどこでも同じように変化するのではなく，細胞単層近傍でのみ変化すると考えられ，前述の全溶液内の濃度を均一に変えた場合とは状況が異なる．すなわち，細胞単層近傍における蛍光微粒子の濃度が変化しても，流路内全体ではその変化は小さくなってしまい，蛍光強度がほとんど変化しない可能性がある．そこで，濃縮が起こっているような状況を作り出し，濃縮量を変化させた時に蛍光強度がどの程度変化するかを調べることにした．

濃縮量を確実に大きく変化させるには，灌流圧を変化させて細胞単層を透過する水分の透過速度を変化させるのが最も効果的である．Wada and Karino (1999) による理論的検討の結果，灌流流量を変化させることによって壁せん断速度を 1 sec^{-1} からその 100 倍の 100 sec^{-1} に変えても，リポ蛋白の壁面濃度は 40 %程度しか変化しないが，水透過速度を 5×10^{-6} cm/sec からその 2 倍の 10×10^{-6} cm/sec に変化させるだけで壁面濃度が37 %変化することが示されている．そこで，灌流圧を 10, 20, 30, 50, 100 mmHg と段階的に変化させ，そのときの蛍光強度を測定した．その結果，図５-２ に示したように灌流圧の大きさに応じて蛍光強度が変化することがわかった．このことから，共焦点を用いない蛍光法でも濃縮度合いの変化を測定できることがわかった．

蛍光法における測定には，必ず不確定な要素が含まれる．それは蛍光微粒子の褪色による蛍光の減衰である．励起された蛍光色素の一部は酸素と化学反応を起こして崩壊し，蛍光を発しなくなってしまう．このことを褪色（photo-bleaching）と呼

んでいる．褪色が起こる条件やその速度等については全くわかっていない．この褪色過程のため，同じ試料を同じ条件で２度と計測できない．これが本実験において直面した最も大きな問題であった．全ての実験において同じ光量の励起光を照射し，同じ温度の条件下で灌流したが，褪色の起こり方は毎回異なっていた可能性がある．事実，個々のデータを見てみると，時間と共に蛍光強度のベースラインが上昇しているものもあれば，下降しているものもあった．このことは，褪色の起こり方にかなりの標本差があったことを示している．図に示した平均値のデータについては，実験開始後の最初の条件下における最終値で正規化したが，この標本差の大きな褪色のために，時間が経つにつれてデータの標準偏差値が増大する傾向が見られた．このことから，データの標準偏差値を用いて，平均値間の有意差等を検討することにはあまり意味がないと思われる．しかし，蛍光強度に変化があるかどうかについては十分に評価できると考えた．

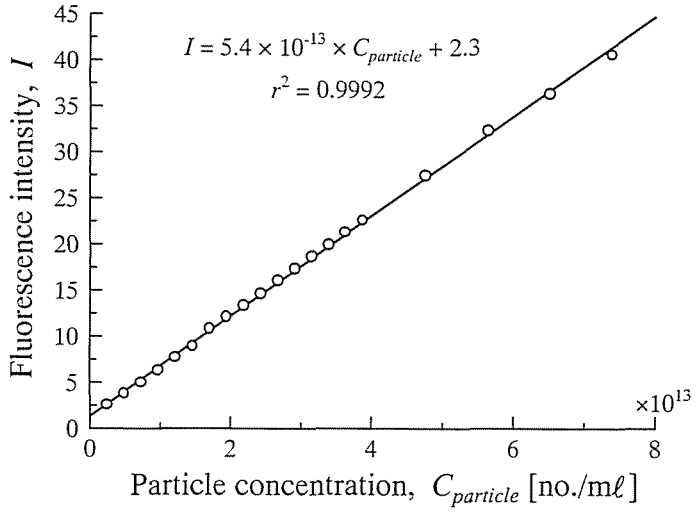

図５-１０．蛍光強度の較正線

A calibration line between fluorescence intensity and particle concentration. Fluorescence intensity is well correlated with particle concentration.

5.4.2. 培養内皮細胞単層による巨大分子の取り込みにおよぼす灌流圧力の影響

灌流圧に依存した蛍光強度の変化には，内皮細胞単層上に濃縮された蛍光微粒子の量の変化の他に，内皮細胞単層内に取り込まれた蛍光微粒子の量の変化も含まれ

ている．図５-２において，各圧力下における蛍光強度の値からその次に測定した10 mmHgにおける蛍光強度の値を引いた値が，その圧力を加えた場合に濃縮によって増加した細胞表面上における灌流液中の蛍光微粒子の量を表すと考えられる．そこで，その分に対応する蛍光強度の値を濃縮蛍光強度と呼ぶことにする．一方，基準値として設定した10 mmHgより高い灌流圧に設定した20分間に細胞単層内に取り込まれ，蓄積された蛍光微粒子の量は，その圧力に設定した前後の 10 mmHgにおける蛍光強度の差（増分）に反映されていると考えられる．そこでこれを蓄積蛍光強度と呼ぶことにする．

このようにして求めた濃縮蛍光強度の値を，10 mmHg で正規化した圧力差に対してプロットすると図５-１１のようになり，これより濃縮蛍光強度が圧力にほぼ比例して変化すること，すなわち灌流圧に依存して蛍光微粒子の濃縮が起こることがわかった．また，背景の明るさがほぼ等しい２カ所における値を比較すると，上流側の方が濃縮蛍光強度の値が小さく，濃縮量が少ないことがわかった．この灌流圧による影響には，細胞単層の両側の圧力差によって決定される細胞単層を透過する水分の透過速度が直接関与していると考えられる．そこで，蛍光強度の測定中に同時に測定した水透過速度と濃縮蛍光強度との関係を調べた．図５-１３はその結果を示した図で，これより確かに両者の間には強い正の相関があることがわかった．

各圧力下における蓄積蛍光強度も図５-１２に示したように圧力に依存して変化した．しかし，それらの関係を表す線は，直線ではなく，上に凸な曲線であった．これは細胞単層内に取り込まれる蛍光微粒子の量が特に低灌流圧領域で灌流圧の影響を受けて大きく変化することを示している．その理由については，はっきりとはわからない．灌流圧を少し上げることにより粒子の濃縮の程度が大きくなり，細胞内への取り込みも促進されると思われるが，実際には細胞内の粒子濃度が高くなると取り込み速度が低下するのではないかと考えられる．高灌流圧領域で蓄積蛍光強度の灌流圧依存性が低下するのは，このような理由によるのではないだろうか．

濃縮蛍光強度と蓄積蛍光強度との関係は，図５-１４に示したようになり，両者の間には強い相関関係があることがわかった．蛍光微粒子の取り込みは，水透過速度に依存した濃縮現象による粒子の細胞表面での濃度の増大とともに増えること

が予想される．このことについては，灌流圧を一定に保ち流速の影響を調べた実験の結果により，より一層はっきりすると思われる．次項で詳しく考察する．

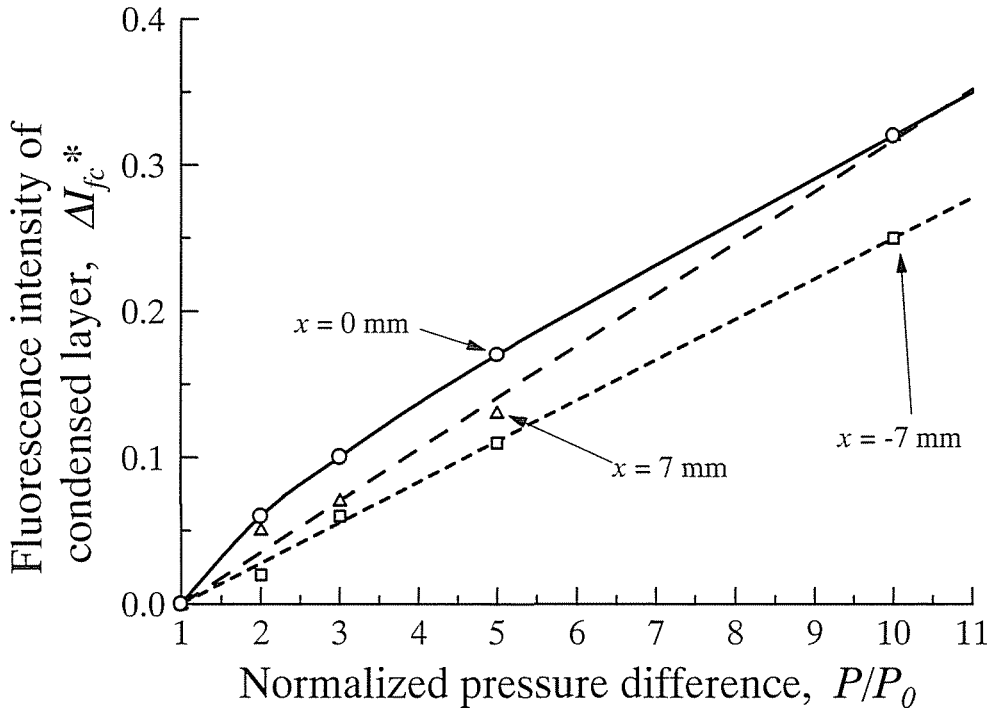

図５-１１．濃縮蛍光強度におよぼす灌流圧の影響

Wall shear rate was set to 100 sec^{-1}. Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Empty rectangle, circle, and triangle show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively. Experimental data are presented as a mean for n = 3.

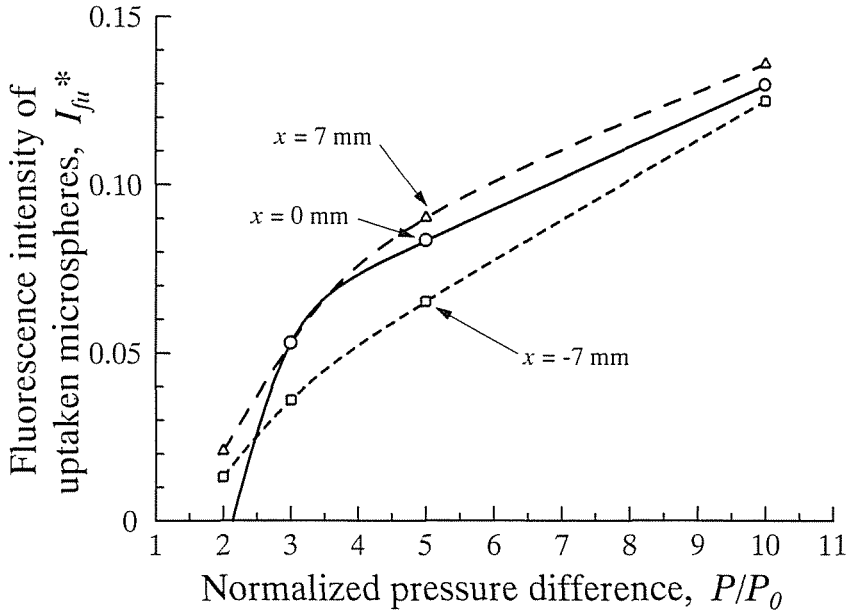

図５-１２．蓄積蛍光強度におよぼす灌流圧の影響

Wall shear rate was set to 100 sec^{-1}. Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Empty rectangle, circle, and triangle show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively. Experimental data are presented as a mean for n = 3.

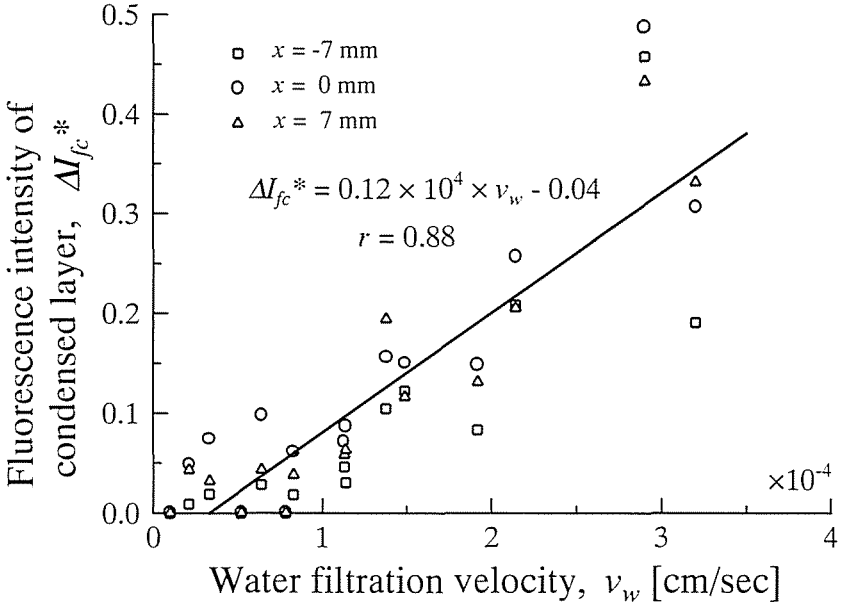

図５-１３．濃縮蛍光強度におよぼす水透過速度の影響

Wall shear rate was set to 100 sec^{-1}. Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Empty rectangle, circle, and triangle show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively. Three sets of experimental data are presented.

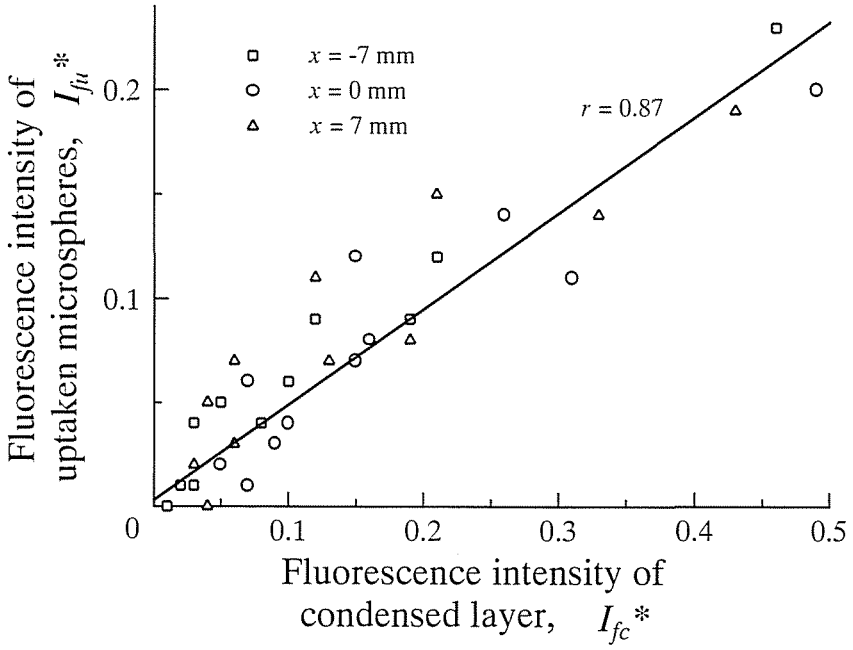

図５-１４．濃縮蛍光強度と蓄積蛍光強度との関係

Relationship between fluorescence intensity of condensed layer and that of uptaken microspheres. Wall shear rate was set to 100 sec^{-1}. Measurements were carried out with a cell culture medium containing serum at 20 % by volume. Empty rectangle, circle, and triangle show the results obtained at the positions of x = -7, x = 0, and x = 7 mm, respectively. Three sets of experimental data are presented.

5.4.3. 培養内皮細胞単層による巨大分子の取り込みにおよぼす流速(流量)の影響

灌流圧を一定にして灌流流量のみによる影響を調べるために行った実験では，壁せん断速度が 100～1500 sec^{-1} の範囲では蛍光強度はほとんど変化しなかった．そのため，この範囲のせん断速度における実験からは，濃縮蛍光強度も蓄積蛍光強度も求めることはできなかった．しかしながら，図５-４において，せん断速度を 0 から 50 sec^{-1} の範囲で変化させたときには蛍光強度に変化が現れたので，このデータから壁せん断速度が 1000 sec^{-1} の時の状態を基準にして濃縮蛍光強度と蓄積蛍光強度を算出した．その結果，蓄積蛍光強度において本節５.４.１で述べた蛍光微粒子の褪色の影響が現れて，その値が負になっているものの，表５-１に示したように壁せん断速度の大きさに応じて蛍光微粒子の濃縮度合いと内皮細胞単層内に取り込まれた蛍光微粒子の量が変化していることがわかった．そしてその関係は，壁せ

ん断速度が小さいほど細胞単層近傍の灌流液中の蛍光微粒子量が多くなるという傾向であり，まさしく蛍光微粒子の流速依存性濃縮現象が起こっていることを示している．この実験では，内皮細胞単層に負荷する差圧を一定に保っているが，第３章で明らかになったように，壁せん断速度が大きいほど水透過速度は高くなっている．しかし，細胞単層内に蓄積された蛍光微粒子の量はそれとは逆で，壁せん断速度が大きいほど少なく，蛍光微粒子の濃縮度合いの変化と同じ傾向を示した．前項の灌流圧の影響を考察した際には，灌流圧に依存して水透過速度が変化していたために，蛍光微粒子の濃縮度合いと細胞単層内に蓄積された蛍光微粒子量との間の関係ははっきりしなかったが，ここで考察した流速の影響の結果から，蛍光微粒子の濃縮度合いが細胞単層内に蓄積される蛍光微粒子の量に直接影響していることが明らかになった．

表５-１．濃縮蛍光強度および蓄積蛍光強度におよぼす壁せん断速度の影響

壁せん断速度	0	10	50
濃縮蛍光強度	0.41	0.07	0.04
蓄積蛍光強度	0.05	-0.01	-0.05

データは３回の実験における（n = 3）３点（x = -7, 0, 7 mm）での値の平均値である．

5.4.4. 培養内皮細胞単層による巨大分子の取り込みにおよぼす他の現象の影響

リポ蛋白などの巨大分子は，内皮細胞の小胞によって細胞内に取り込まれ，ある物はその細胞内で分解され，ある物は細胞の反対側へ移動し，分泌され，細胞を透過する．低密度リポ蛋白の場合，その細胞によって分解される物はそのほとんどがLDL 受容体を介して小胞により輸送されるのに対して，細胞を透過する物は受容体を介さない食作用（phagocytosis）による小胞輸送によって輸送される（Vasile et

al., 1983)．蛍光微粒子はこの食作用による小胞輸送により細胞を透過するが，この小胞輸送能が流れによって負荷されるせん断応力の大きさにより変化している可能性がある．Sprague et al. (1987) は，培養血管内皮細胞による低密度リポ蛋白の取り込みが高せん断の流れによって促進されることを報告している．この取り込みには，受容体を介した取り込みと食作用の両方が含まれている．また，細胞の飲作用（pinocytosis）もせん断応力の変化により促進されることが Devies et al. (1984)によって報告されている．しかし，それらの変化は，壁せん断応力が高い場合に生じ，本研究で得られた低せん断速度下において蛍光微粒子が多く取り込まれるという結果とは逆の傾向である．このことから，例え，せん断応力に依存して細胞の食作用が変化していたとしても，それが細胞単層に取り込まれる微粒子の総量におよぼす影響は，微粒子の流速依存性濃縮現象による影響に比べて小さいと言える．

その他にも流速依存性濃縮現象以外に巨大分子の取込みに影響をおよぼすと思われる現象が幾つかあるが，それについては別途検討する必要がある．

5.5. 結言

本章では，血管壁のモデルとして培養血管内皮細胞単層を，リポ蛋白のモデル並びにトレーサとして蛍光微粒子を用い，灌流条件を変化させて細胞単層とその近傍の灌流液の蛍光強度を測定することにより，血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象について検討を行った．その結果，以下のことがらが明らかになった．

1) 蛍光法により圧力変化により起こる蛍光微粒子の濃縮度合いの変化を測定できる．
2) 流量の変化により蛍光微粒子の濃縮度合いが変化する．
3) 蛍光微粒子の濃縮度合いの変化は，流速が遅いほど大きく現れる．
4) 細胞単層に取り込まれる蛍光微粒子の量は，蛍光微粒子の濃縮度合いにほぼ比例する．

以上のことから，血管内皮のモデルとして用いた培養血管内皮細胞単層表面近傍においてリポ蛋白と同程度の大きさの蛍光微粒子の流速依存性濃縮現象が確かに起こっていることが明らかになった．さらに，その現象により，内皮細胞単層に取り込まれる蛍光微粒子の量が大きく影響されることがわかった．本研究で用いた蛍光微粒子は，低密度リポ蛋白と同程度の大きさであり，低密度リポ蛋白と同様の挙動を示すと考えられることから，生体血管内においても血管内皮表面上で低密度リポ蛋白の流速依存性濃縮現象が起こっていて，低密度リポ蛋白の濃度が血管内の流れの状態に応じて局所的に異なっていることが示唆された．

参考文献

DAVIES, P.F., DEWEY, C.F., BUSSOLARI, S.R., GORDON, E.J., AND GIMBRONE, M.A. (1984), Influence of hemodynamic forces on vascular endothelial function – In vitro studies of shear stress and pinocytosis in bovine aortic cells. *J. Clin. Invest.* **73**, 1121-1129.

SPRAGUE, E.A., STEINBACH, B.L., NEREM, R.M., AND SCHWARTZ, C.J. (1987), Influence of a laminar steady-state fluid-imposed wall shear stress on the binding, internalization, and degradation of low-density lipoproteins by cultured arterial endothelium. *Circulation* **76**, 648-656.

VASILE, E., SIMIONESCU, M., AND SIMIONESCU, N. (1983), Visualization of the binding, endocytosis, and transcytosis of low-density lipoprotein in the arterial endothelium in situ. *J Cell Biology* **96**, 1677-1689.

WADA, S., and KARINO, T. (1999), Theoretical study on flow-dependent concentration polarization of low density lipoproteins at the luminal surface of a straight artery. *Biorheology* **36**, 207-223.

第6章 本研究の結論

本研究は，動脈硬化症の局在化機構として，コンピュータ・シミュレーションによる血中リポ蛋白の血管壁への物質移動の理論的解析の結果に基づいて狩野および和田により提唱された仮説，すなわち「血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象」，に関して，その真偽を実験的に検証したものである．

まず初めに，血管壁のモデルとして多孔質フィルタ上に播種培養したウシ大動脈由来内皮細胞単層を用い，これを平行平板型流路の一部になるように装着し，循環システムを用いてウシ胎児血清またはリポ蛋白を含んだ培養液を37°C，一定圧力，定常流の条件下で流量を色々変化させて灌流し，細胞単層における水透過速度が細胞表面における血漿蛋白やリポ蛋白など，巨大分子の濃度によって変化することを利用して，内皮細胞単層表面におけるリポ蛋白の濃度におよぼす流速（壁せん断速度）の影響について検討を行った．その結果，灌流液中に巨大分子が存在しない場合には流速を変化させても水透過速度は全く変化しないが，血清やリポ蛋白を含んでいる灌流液を用いた場合には，灌流速度の変化に応じて水透過速度が可逆的に変化し，灌流速度が低いほど，そして灌流液中の血清濃度，したがってリポ蛋白の濃度，が高いほど，水透過速度が低くなることがわかった．また，分子サイズの大きいリポ蛋白の方が分子サイズの小さいアルブミンよりも大きな変化を起こすことがわかった．以上の結果を水透過速度と細胞単層表面上における巨大分子の濃度との関係を用いて灌流速度と巨大分子の表面濃度との関係に変換すると，壁せん断速度が低いほど，そして，巨大分子のサイズが大きいほど，内皮細胞単層表面上における巨大分子の濃度が高くなっていることになり，生理的条件下において，内皮細胞単層上において確かにリポ蛋白の流速に依存した濃縮現象が起こることがわかった．

次に，先の内皮細胞単層を用いた実験で観察された水透過速度の変化が，内皮細胞のリポ蛋白存在下での小胞輸送能の壁せん断応力に依存した変化により起こったものであるか，あるいは，理論解析により示されたような単なる物理現象であるのかを見極める目的で，透析用半透膜チューブを血管のモデルとして用いて上記と

同様の灌流実験を行った．その結果，内皮細胞単層を用いた場合と同様に，灌流液中に血漿蛋白やリポ蛋白が存在する場合にのみ，流速の変化に応じて管壁における水透過速度が可逆的に変化し，半透膜表面上でも細胞単層の場合と同様の流速に依存した水透過速度の変化が起こることがわかった．また，分子サイズの影響に関しても直径の大きいリポ蛋白の方がアルブミンよりも水透過速度に大きな影響をおよぼすことがわかった．以上の結果より，先の内皮細胞単層を用いた流れの実験で観察された流速に依存した水透過速度の変化が内皮細胞の生理的機能によるものではなく，単なる物理的現象，すなわち，流速に依存したリポ蛋白の濃縮現象によるものであることが明らかになった．

最後に，リポ蛋白の流速に依存した濃縮現象を顕微鏡を通して直接観察する試みとして，血管壁のモデルとして培養血管内皮細胞単層を，そして，リポ蛋白のモデル並びにトレーサとして低密度リポ蛋白とほぼ同じ大きさの蛍光ポリスチレン微粒子を用いた同様の灌流実験を行い，細胞単層およびその近傍の灌流液における蛍光微粒子の濃度変化を蛍光顕微鏡と顕微測光装置により測定した．その結果，細胞単層近傍における蛍光微粒子の濃度が流速および灌流圧に依存して変化し，流速が低いほど，そして灌流圧が高いほど高くなることがわかった．また，細胞単層近傍における蛍光微粒子の濃度にほぼ比例して内皮細胞単層に取り込まれる微粒子の量も増大することがわかった．用いた蛍光微粒子は，低密度リポ蛋白と同程度の大きさで，低密度リポ蛋白と同様の挙動を示すと考えられることから，生体血管内の血管内皮表面上で流速に依存した低密度リポ蛋白の濃縮が起こっていて，低密度リポ蛋白の濃度が血管内の流れの状態に応じて局所的に異なっていることを本研究は示した．

以上，３つのモデル実験により得られた結果を総括し，次の結論を得た．

１．培養血管内皮細胞単層および半透膜のいずれの場合にも，管壁が半透性すなわち，巨大分子に対して分子ふるいとして振る舞い，水分に対するよりも低い透過性しか示さない場合は，生理的範囲内の水透過速度および壁せん断速

度の条件下でも理論的解析により示唆されたとおり，確かに流速に依存したリポ蛋白の濃縮現象が起こる．

2．内皮細胞単層に取り込まれるリポ蛋白の量は，内皮細胞単層上で起こっているリポ蛋白の流速依存性濃縮現象によって変化する．

本研究では，不透明な血管内の，しかも，ごく壁近傍の流れの場で，動的な平衡状態において起こっている流速に依存したリポ蛋白の濃縮現象を直接観察し，計測することが技術的に難しいことから，モデル実験により水透過速度におよぼす流れおよびリポ蛋白の濃度の影響を調べることにより間接的に検証し，一応，生理的条件下でこの現象が起こり得ることを確認した．今後，さらに生体血管内で起こっていることを直接検証する方法の開発に努力し，この発見を確実なものにしたい．

謝辞

本研究は，北海道大学大学院工学研究科生体工学専攻博士課程の２年間および，北海道大学電子科学研究所自律調節研究分野の助手として在職した６年間に行われたものである．

本研究を進めるにあたり終始ご指導いただいた北海道大学電子科学研究所の狩野 猛教授に深く感謝いたします．

大学院在籍中に本論文の基盤となる研究をご指導いただいた大阪大学基礎工学部の林 紘三郎教授に感謝いたします．

研究を進めるにあたり，理論的な側面より有益な助言を頂いた北海道大学電子科学研究所の和田 成生講師，そして生物学的，生化学的な側面より助言を頂いた同研究所の丹羽 光一助手に感謝いたします．

第３章の研究を共同で行った北海道大学大学院工学研究科修士課程修了生の田代 ルミさん，杉山 博信君に感謝いたします．

本論文の研究の一部は，以下の文部省科学研究費補助金により行われたことを記し，謝意を表します．

平成３年度　特別研究員奨励費（内貴，No. 0155）

平成５年度　重点領域研究（2）「バイオメカニクス」（狩野，No.05221203）

平成６年度　重点領域研究（2）「バイオメカニクス」（狩野，No.06213202）

平成８年度　一般研究（B）（狩野，No.08457292）

平成 10 年度　奨励研究（A）（内貴，No.10780523）

平成 11 年度　奨励研究（A）（内貴，No.10780523）

最後に，本論文は，これら関係各位の御協力とご援助により初めて完成することができました．ここに改めて深く感謝の意を表します．

平成１２年２月

発表論文

1．論　文（学位論文関係）

(1) 内貴　猛，竹村真一，林紘三郎：「大動脈分岐部拍動流に及ぼす血管弾性の影響（モデル管内流れの可視化による検討）」日本機械学会論文集Ｂ編, Vol. **60**, pp.3623-3629（1994）

(2) T. Naiki, K. Hayashi and S. Takemura : "A LDA and flow visualization study of pulsatile flow in an aortic bifurcation model", *Biorheology*, Vol. **32**, pp.43-59 (1995)

(3) K. Hayashi, Y. Yanai and T. Naiki : "A 3D-LDA study of the relation between wall shear stress and intimal thickness in a human aortic bifurcation", *Trans. ASME, J. of Biomechanical Engineering*, Vol. **118**, pp.273-279 (1996)

(4) T. Naiki, H. Sugiyama, R. Tashiro and T. Karino : "Flow-dependent concentration polarization of plasma proteins at the luminal surface of a cultured endothelial cell monolayer", *Biorheology* **36**, pp.225-241 (1999)

(5) T. Naiki and T. Karino : "Flow-dependent concentration polarization of plasma proteins at the luminal surface of a semipermeable membrane", *Biorheology* **36**, pp.243-256 (1999)

(6) T. Naiki and T. Karino : "Visualization of flow-dependent concentration polarization of macromolecules at the surface of a cultured endothelial cell monolayer by means of fluorescence microscopy", *Biorheology*（投稿中）

2．論　文（その他）

(1) 内貴　猛，松本健郎，林紘三郎：「人工血管・生体血管吻合部におけるコンプライアンスミスマッチの流れに対する影響」人工臓器, Vol. **19**, pp.1306-1309（1990）

(2) T. Matsumoto, T. Naiki and K. Hayashi : "Flow visualization analysis in a model of artery-graft anastomosis", *Bio-Medical Materials and Engineering*, Vol. **2**, pp.171-183（1992）

(3) T. Matsumoto, T. Naiki and K. Hayashi : "Flow visualization analysis of pulsatile flow in elastic straight tubes", *Biorheology*, Vol. **31**, pp.365-381（1994）

(4) 内貴　猛，箭内　豊，林紘三郎：「血液モデルとしての高分子溶液の評価（血流モデル実験のための基礎研究）」日本バイオレオロジー学会誌, Vol. **9**, pp.84-89（1995）

(5) 内貴　猛，川口　学，狩野　猛：「弁無し拍動流血液ポンプの開発に関する研究」日本機械学会論文集Ｃ編, Vol. **63**, pp.680-685（1997）

(6) T. Naiki, Y. Kanegawa, and T. Karino : "Relationship between arterial diameter and blood flow rate at major arterial bifurcations of the dog", *JSME International J.*, Vol. 42, pp.656-663 (1999)

3．講　演（学位論文関係）

(1) 内貴　猛，狩野　猛：「血管内膜表面上におけるリポ蛋白の濃縮現象（水透過速度に及ぼす血清濃度及び流れの影響）」第１回電子科学研究所研究発表会（1993）

(2) 内貴　猛，狩野　猛：「半透膜における水透過速度に及ぼす血清濃度及び流れの影響」第 33 回日本エム・イー学会大会（1994）

(3) 内貴　猛，河原圭治，狩野　猛：「人工高分子物質の動脈硬化症発症抑制効果の検討」第 2 回電子科学研究所研究発表会（1994）

(4) 狩野　猛，内貴　猛，田代ルミ：「血管内壁表面上におけるリポ蛋白の濃縮現象について－動脈硬化，内膜肥厚，脳動脈瘤形成との関係－」第 14 回北海道リポ蛋白研究会（1995）

(5) 河原圭治，内貴　猛，狩野　猛：「動脈硬化発症に対するセパランの抑制効果」第 34 回日本エム・イー学会大会（1995）

(6) T. Karino, X. Deng, and T. Naiki : “Flow-dependent concentration polarization of lipoproteins at the blood-endothelium boundary”, ASME 1995 Bioengineering Conference (1995)

(7) 杉山博信，内貴　猛，田代ルミ，狩野　猛：「血管内皮表面上におけるリポ蛋白の濃縮現象に及ぼす流れの影響」第 34 回日本ＭＥ学会北海道支部大会（1995）

(8) 内貴　猛，田代ルミ，杉山博信，狩野　猛：「血管内皮細胞単層上におけるリポ蛋白の濃縮現象」第 9 回日本エム・イー学会秋季大会（1995）

(9) 内貴　猛，狩野　猛：「蛍光強度測定による血管内皮表面上における巨大分子の流速依存性濃縮現象の解明」第 7 回バイオエンジニアリング学術講演会夏季セミナー（1996）

(10) 杉山博信，内貴　猛，狩野　猛：「水透過速度測定による血管内皮表面上における流速依存性濃縮現象の解明」第 7 回バイオエンジニアリング学術講演会夏季セミナー（1996）

(11) 杉山博信，内貴　猛，田代ルミ，狩野　猛：「血管内皮細胞単層上における巨大分子の流速依存性濃縮現象」第 13 回ＭＥ研究会（1996）

(12) 内貴　猛，杉山博信，狩野　猛：「血管内皮細胞による巨大分子の取り込みに及ぼす血清濃度およびせん断速度の影響」第 9 回バイオエンジニアリング講演会（1997）

(13) 内貴　猛，杉山博信，田代ルミ，狩野　猛：「血管内皮細胞単層上のリポ蛋白濃度に及ぼす壁せん断速度の影響」第 36 回日本ＭＥ学会大会（1997）

(14) 内貴　猛，狩野　猛：「血管内におけるリポ蛋白の濃縮現象」第 20 回「計測と力学－生体への応用」研究会（1997）

(15) T. Naiki, H. Sugiyama, R. Tashiro, and T. Karino : “The effect of Flow on the concentration of lipoproteins at the surface of cultured endothelial cell monolayers”, Third World Congress of Biomechanics (1998)

(16) 坂井友幸，内貴　猛，狩野　猛：「培養血管内皮細胞の物質取り込みにおよぼすせん断流れの影響」日本機械学会第 76 期全国大会（1998）

(17) 狩野　猛，和田成生，内貴　猛：「血管病の局在化機構に関する一仮説－血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮・枯渇現象－」日本機械学会第 76 期全国大会（1998）

(18) 内貴　猛，坂井友幸，狩野　猛：「血管内皮細胞の物質取り込みにおよぼす流れの影響」第 6 回電子科学研究所研究発表会（1998）

(19) 内貴　猛，河原圭治，狩野　猛：「家兎における人工高分子物質投与の血液粘度に与える影響」第19回バイオメカニズム学術講演会（1998）

(20) 内貴　猛：「動脈内血流を調べるための流体モデル実験」平成10年度第3回流体工学研究会（1999）

(21) 内貴　猛，河原圭治，狩野　猛：「動脈硬化症発症におよぼす血液粘度の影響」第11回バイオエンジニアリング講演会（1999）

(22) Takeru Naiki and Takeshi Karino : "Visualization of flow-dependent concentration polarization of macromolecules at the surface of a vascular endothelium by means of fluorescence microscopy", ASME 1999 Summer Bioengineering Conference（1999）

(23) T. Karino, S. Wada and T. Naiki : "A new hypothesis on the mechanism of localization of vascular diseases – Flow-dependent concentration / depletion of lipoproteins at the luminal surface of an artery", 10th International Congress of Biorheology (1999)

(24) 内貴　猛，坂井友幸，狩野　猛：「培養血管内皮細胞単層による巨大分子取り込みにおよぼす流れおよび壁透過性の影響」第12回バイオエンジニアリング講演会（2000）

(25) その他，弾性モデル実験による生体内血流のシミュレートと動脈硬化の発生進展要因の追求に関した講演14回

4．　講　演（その他）

(1)　その他，剥離泡内の三次元渦構造に関連した講演3回

(2)　その他，動脈内血流のモデルとしての弾性管内拍動流の可視化観察に関連した講演9回

(3)　その他，高分子水溶液の非ニュートン性における動的粘弾性に関した講演1回

(4)　その他，肺気道内の流れと肺癌の好発部位との関係に関した講演3回

(5)　その他，移植生体由来人工血管の水透過性に関した講演1回

(6)　その他，弁無し拍動流血液ポンプの開発に関した講演3回

(7)　その他，主要動脈の分岐後の血管形状に関した講演2回

(8)　その他，分岐管における懸濁粒子の分配に関した講演2回

(9)　吉田直人，坂井友幸，内貴猛，金城政孝，田村　守：「Ru錯体分子の細胞内酸素プローブへの応用」第35回日本生物物理学会年会（1997）

(10) N. Yoshida, T. Sakai, T. Naiki and M. Tamura : "A ruthenium complex as an intracellular oxygen probe in vivo", 27th Annual Meeting International Society on Oxygen Transport to Tissue (1999)

5．　特　許

な　し

以　上

博士論文

血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象に関する実験的検討

2000 年 2 月 4 日　印刷

著者　**内貴　猛**

Takeru NAIKI

北海道大学　大学院　工学研究科

システム情報工学専攻