

糖尿病における血栓形成性と血管内皮遺伝子発現に関する研究

2007 年度

中 楯 浩 康

目次

第1章 序論	1
1.1 緒言.....	1
1.2 血栓症と血管障害.....	1
1.3 糖尿病と血管障害.....	3
1.3.1 糖尿病人口の現状.....	3
1.3.2 糖尿病における血小板機能異常.....	3
1.3.3 糖尿病における血管内皮機能障害.....	5
1.4 本研究の目的.....	5
1.5 本論文の構成.....	5
参考文献.....	6
第2章 糖尿病モデル動物を用いた血栓形成性の検討	8
2.1 緒言.....	8
2.2 試薬と方法.....	8
2.2.1 実験動物.....	8
2.2.2 光化学反応刺激による血栓モデル.....	9
2.2.3 血流計測と血栓形成評価.....	10
2.2.4 電子顕微鏡観察.....	10
2.2.5 統計解析.....	11
2.3 結果.....	11
2.3.1 生理的パラメータ.....	11
2.3.2 糖尿病モデル動物における血栓形成性の亢進.....	12
2.4 考察 - 血栓形成における血小板と血管内皮細胞の関与 -	15
2.5 結言.....	16

参考文献.....	16
-----------	----

第3章 糖尿病患者における血栓形成性の検討.....19

3.1 緒言.....	19
3.2 血小板凝集.....	20
3.2.1 アゴニスト惹起血小板凝集.....	20
3.2.2 剪断応力惹起血小板凝集.....	21
3.3 血小板凝集能測定.....	21
3.3.1 透過光法.....	21
3.3.2 散乱光法.....	23
3.4 試料と方法.....	24
3.4.1 レーザ散乱粒子計測法による血小板凝集能測定.....	24
3.4.2 データ解析.....	26
3.4.3 血小板の前処理.....	28
3.4.4 実験プロトコール.....	28
3.4.5 統計解析.....	28
3.5 結果.....	29
3.5.1 自然凝集.....	29
3.5.2 ADP 惹起凝集.....	30
3.5.3 エピネフリン惹起凝集.....	31
3.5.4 コラーゲン惹起凝集.....	33
3.6 考察 - レーザ散乱粒子計測法による血小板凝集能測定の有用性 -	34
3.7 結言.....	37
参考文献.....	37

第4章 圧力・流量同時制御型拍動性灌流装置の開発.....42

4.1 緒言.....	42
4.2 血管内における機械的応力.....	42

4.2.1	血流刺激.....	42
4.2.2	血圧刺激.....	46
4.3	機械的応力負荷装置.....	46
4.3.1	剪断応力負荷装置.....	46
4.3.2	伸展張力負荷装置.....	47
4.3.3	貫壁性圧力負荷装置.....	48
4.4	圧力・流量同時制御型拍動性灌流装置の開発.....	48
4.4.1	3要素 Windkessel モデル.....	48
4.4.2	構成要素.....	49
4.4.3	シミュレーション.....	52
4.5	システム評価.....	54
4.5.1	抵抗値測定.....	54
4.5.2	シミュレーション値と測定値との精度比較.....	55
4.5.3	生体内測定値の再現.....	57
4.6	システムの有用性と改善点.....	58
4.7	結言.....	59
	参考文献.....	60

第5章 血管内皮細胞形態における血行力学的応力の影響.....65

5.1	緒言.....	65
5.2	血行力学的応力に対する内皮細胞応答.....	65
5.2.1	血行力学的応力に対する細胞形態と細胞配向性の変化.....	65
5.2.2	血行力学的応力に対する細胞骨格の変化.....	67
5.2.3	血行力学的応力に対する細胞間接着の変化.....	68
5.3	試料と方法.....	68
5.3.1	細胞培養.....	69
5.3.2	実験条件.....	69
5.3.3	細胞形態観察および解析.....	69

5.3.4	細胞骨格観察.....	70
5.3.5	細胞間接着観察.....	70
5.4	結果.....	71
5.4.1	細胞形態観察および解析.....	71
5.4.2	細胞骨格分子観察.....	77
5.4.3	細胞間接着分子観察.....	81
5.5	考察.....	85
5.5.1	単独応力負荷と複合応力負荷の違い.....	85
5.5.2	定常流と拍動流の違い.....	87
5.6	結言.....	88
	参考文献.....	88

第6章 血管内皮遺伝子発現における血行力学的応力の影響.....92

6.1	緒言.....	92
6.2	血行力学的応力と遺伝子発現.....	94
6.2.1	剪断応力に対する遺伝子発現変化.....	94
6.2.2	伸展張力および貫壁性圧力に対する遺伝子発現変化.....	94
6.3	リアルタイム RT-PCR 法.....	95
6.3.1	リアルタイム RT-PCR 法の原理.....	95
6.3.2	比較定量法.....	96
6.4	試料と実験方法.....	97
6.4.1	実験プロトコール.....	97
6.4.2	測定および解析.....	98
6.4.3	統計解析.....	99
6.5	結果.....	99
6.5.1	拍動流負荷における遺伝子発現の経時的変化.....	99
6.5.2	単独応力負荷と複合応力負荷による遺伝子発現の違い.....	102
6.5.3	定常流負荷と拍動流負荷による遺伝子発現の違い.....	105

6.5.4	正常圧力負荷と高圧力負荷による遺伝子発現の違い.....	107
6.5.5	正常血糖負荷と高血糖負荷による遺伝子発現の違い.....	110
6.6	考察.....	113
6.6.1	拍動流負荷と剪断応力負荷における遺伝子発現の違い.....	113
6.6.2	静水圧, 定常流, 拍動流負荷における遺伝子発現の違い.....	113
6.6.3	高圧負荷における遺伝子発現の増加.....	115
6.6.4	高血糖負荷における遺伝子発現の増加.....	116
6.7	結言.....	117
	参考文献.....	118

第7章 結論.....122

謝辞.....125

著者論文目録.....126

略語一覽

NO: nitric oxide	chain reaction
VEGF: vascular endothelial growth factor	β -GUS: beta-glucuronidase
GP: glycoprotein	M-CSF: macrophage-colony stimulating factor
vWF: von Willebrand factor	TNF- α : tumor necrosis factor-alpha
ADP: adenosine diphosphate	IL-1: interleukin-1
TXA ₂ : thromboxane A ₂	TGF- β : transforming growth factor-beta
PDGF: platelet-derived growth factor	
TM: hrombomodulin	
tPA: tissue plasminogen activator	
PAI-1: plasminogen activator inhibitor-1	
ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1	
VCAM-1: vascular cell adhesion molecule-1	
ET-1: endothelin-1	
eNOS: endothelial nitric oxide synthase	
AGE: advanced glycation nedoproducts	
PKC: protein kinase C	
STZ: streptozotocin	
O ₂ ⁻ : superoxide	
SOD: superoxide dismutase	
PRP: platelet-rich plasma	
PPP: platelet-poor plasma	
LSPA: laser-light scattering platelet analyzer	
SLI: scattered light intensity	
HAEC: human aortic endothelial cells	
MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1	
LDL: low-density lipoprotein	
mRNA: messenger ribonucleic acid	
DNA: deoxyribonucleic acid	
BAEC: bovine aortic endothelial cells	
HUVEC: human umbilical vein endothelial cells	
NF- κ B: nuclear factor-kappa B	
RT-PCR: reverse transcription-polymerase	

第1章 序論

1.1 緒言

医学と工学の学際領域に位置する学問として誕生した生体医工学の研究は、遺伝子解析やバイオイメージング技術、生体材料の開発などの進歩を経て医療に大きく貢献してきた。近年では、遺伝子情報と生体機能の相互関係を統合されたシステムとして把握するフィジオームの重要性が認識され始め、その中でも生体の機能や構造およびその調節機構を力学的観点から解析するバイオメカニクスの発展は著しく、組織工学への応用・展開が期待されている。本研究では、病態における血管のバイオメカニクスに着目し、実験動物を用いた *in vivo* 実験と培養細胞を用いた *in vitro* 実験からシステムティックに検討した。さらに本研究で開発した灌流装置は、*in vitro* 実験だけでなく、摘出血管を用いた *in situ* 実験にも応用が可能であり、今後、血管のバイオメカニクスにおける有用なツールとして期待できる。血管のバイオメカニクスについては後述するが、本章では、本研究で着目した病態における血管障害について病態の社会的背景や病態の成因背景から現在までの知見を踏まえ概説し、本研究の目的、本論文の構成を述べる。

1.2 血栓症と血管障害

血管は、単なる血液のパイプ役にとどまらず、循環、炎症、免疫、代謝などを制御している一つの大きな臓器とも言える。従って、この血管の障害は生体に種々の機能障害を引き起こす。その中でも現代の先進諸国にとって深刻な問題となっているのは、重要臓器の閉塞性血管疾患である。欧米においては、癌による死亡者の割合は全死因の約15%であるが、心筋梗塞、脳梗塞、肺塞栓などの血栓症によるものは40%から50%にも上る[1]。また、我が国においても血栓症による死亡者の割合は、生活の欧米化が進み、飽食の時代が続くにつれて次第に増加し、癌による死亡者の割合である約30%に追いつき追い越す勢いである[1]。そして現在、双方を含むすべての先進諸国で増加し社会問

題となってきたのは、下肢の閉塞性動脈硬化症である。このように血栓症は、重篤の場合には死に至らしめ、本人の生活の質の低下のみならず介護者を含んだ社会全体に障害を与え、その活性度を低下せしめる点において、最も深刻な21世紀の国民病であり、その制圧は本邦においても最重要課題の一つである。一方、血栓が形成される3大要因は血管、血液、血流の異常や障害である。血液成分の凝固作用はもちろんのこと、近年、血管の最内層を構成している血管内皮細胞と血液成分である血小板や白血球との相互作用が、血栓形成とその制御機構において注目されている。またこれらの相互作用は当然血流下で行われる事象であるため、血栓形成部位、殊に血管内皮細胞が暴露されている血流状態の考慮も必至である。以下、血栓症の病的過程の主座を血管内皮細胞に置き、その機能と病態を概説する。

血管内皮細胞は循環制御、炎症・免疫制御、血管新生制御など生体機能に重要な役割を果たす諸システムを制御し、時々刻々とゆらぐ生体の恒常性維持に重要な役割を果たしている。内分泌臓器の一つである膵臓は、生体内のゆらぎ、つまり血液中の血糖の上昇を感知すると、インスリンというホルモンを分泌し血糖の上昇を抑制することで血糖の恒常性を維持しているが、では血管内皮細胞が感知する生体内のゆらぎはなんだろうか。それは血管内皮細胞が血管の最内腔に位置していることから分かるように、血液成分の変化や血流の変化をリアルタイムで感知し血管の恒常性を維持するために様々な応答をしている。例えば、血管が虚血などによる低酸素状態になると、強力な血管拡張物質であるNOや血管内皮細胞増殖因子であるVEGFなどを産生・放出して、血流や血管新生を制御している。これは、NOやVEGFを合成する遺伝子上流に低酸素を感知する分子が内皮細胞上にあるからである[1]。また血管内の血流量が多くなると内皮細胞には強い剪断応力がかかる。すると内皮細胞はそのメカニカルなストレスを生化学的なシグナルに置き換えて、NOの産生を高める[3]。

このように、血管内皮機能障害による血管の恒常性の破綻は、狭窄や壁肥厚、硬化、伸展性の低下が惹起され、それらが亢進すると虚血や血栓を引き起こす。さらに、血管は糖尿病や高血圧、高脂血症などの生活習慣病の標的臓器であり、血管内皮機能障害を促進する。そこで本研究では糖尿病における血管障害にテーマを絞った。次項では、糖尿病における血管障害について概説する。

1.3 糖尿病と血管障害

1.3.1 糖尿病人口の現状

厚生労働省の平成17年患者調査報告[4]によると、わが国の病院および診療所を利用する糖尿病総患者数は約247万人であり、前回の平成14年患者調査報告[5]の約228万人から約19万人増加した。これに対し、平成14年実施された糖尿病実態調査[6]では、糖尿病が強く疑われている人は約740万人、糖尿病予備軍とされる糖尿病の可能性を否定できない人は約880万人と合計で約1620万人に上り、前回調査[7]の平成9年以降250万人も増加していることになる。この調査報告の違いは、糖尿病が自覚症状のほとんどない病気であるため、糖尿病であっても治療を受けていない人が多数存在することに起因するが、治療を受けていない間にも糖尿病は着実に進行し、合併症の危険は少しずつ迫ってきている。糖尿病における慢性高血糖状態は、種々の血管障害を引き起こすが、血管サイズの違いにより、細小血管障害と大血管障害に大別される。細小血管障害は糖尿病に特異的であり、糖尿病性三大合併症と呼ばれる糖尿病網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害を発症させる。これに対し、大血管障害である動脈硬化症などは、糖尿病に特異的な合併症とは言えないが、糖尿病患者が発症する割合は、非糖尿病患者に比し極めて高い。

1.3.2 糖尿病における血小板機能異常

糖尿病における血管合併症の発症と進展には、血小板機能の亢進が大きく関与している。特に2型糖尿病は、加齢とともに、肥満、高血圧、高脂血症などの生活習慣病の一環として発症するが、これらの危険因子は単独でも動脈硬化、血栓症の促進因子でもあるので糖尿病患者においては動脈硬化の進展予防と血栓症の予防、すなわち血小板機能のモニタリングが重要となってくる。

血小板の最も重要な生理機能は、止血機序の第一歩に関与することである。すなわち、血管内皮が損傷され、内皮下組織が露出すると血小板は主としてコラーゲンに粘着するが（血小板粘着）、その機序には血小板表面にある GPIb（正確には GPIb/IX/V 複合体：

CD42) が vWF を介して粘着する。GPIb は血小板 1 個当たり 20,000–40,000 分子存在している。また、数は少ないが vWF を介さずに内皮下組織に結合し得る GPIa/IIa も重要である。次いで粘着した血小板に様々な刺激が働き、血小板が活性化すると粘着した血小板内にある濃染顆粒、特殊顆粒 (α 顆粒)、リゾチーム、ミクロペルオキシダーゼの 4 種の顆粒からその内容物が放出され (放出反応) 血小板は互いに凝集する。この際 GPIIb/IIIa 複合体が必要で、ADP やトロンビンなどのアゴニスト (agonist) の刺激により立体構造が変化し、フィブリノゲンを介して血小板が互いに結合する。またこの際、 α 顆粒から放出されるトロンボスポンジンは凝集を補強し、また血小板の α 顆粒内にある細胞接着因子の一つである P-セレクチンは、血小板が活性化すると細胞表面に移行し、好中球、単球、リンパ球を接着させる。また、血小板凝集が起こると血管収縮も起こり、血流は緩やかになる。更に、血管の損傷部位の組織や赤血球からも ADP が供給され、血小板凝集がますます強くなる。一方、血小板から放出された血小板第 3 因子をはじめとする血小板因子と損傷部位からの組織トロンボプラスチンにより、血漿中のプロトロンビンの一部がトロンビンに転化し、この局所的に産生された少量のトロンビンが血小板に作用して、血小板粘性変態を起こさせる。すなわち血小板は膨化し、細胞質内の顆粒は互いに脱顆粒を起こし偽足を出して血管損傷部位を覆い、血小板血栓が形成され止血がみられる (一次止血)。通常の出血時間の検査はこの時点をみているわけである。また、血小板第 3 因子は内因性凝固機序を促進し、外因性機序と相まって血小板血栓の周囲にフィブリンを形成し、強固な凝固血栓が完成する。

しかし、糖尿病においては血管損傷部位などによる止血機構が働いていない状態においても、循環血液中における活性化血小板の増加や[8],[9]、血小板粘着能の亢進[10]-[12]、血小板凝集能の亢進[12]-[14]が報告されている。特に、血小板が活性化することにより発現が増加したP-セレクチンは、血小板が白血球や内皮細胞に接着し易くさせ、血小板—白血球、血小板—内皮細胞接着の結果、双方の細胞には更なる活性化シグナルが入り、血小板からは血小板凝集作用を持つTXA₂や血小板由来血管内皮増殖因子であるPDGFなどの生理活性物質や、白血球からは炎症性サイトカインなどが放出される。よって、糖尿病患者の循環血液中における慢性的な血小板の活性化は、動脈硬化の加速や糖尿病性血管障害、さらには血栓症の発症や進展に大きな役割を果たすと考えられる。

1.3.3 糖尿病における血管内皮機能障害

糖尿病性合併症の基本は血管障害であり、細小血管障害と虚血性心疾患、脳血管障害、閉塞性動脈硬化症などの大血管障害に分類される。動脈硬化によって引き起される大血管障害の発症と進展には血管内皮機能障害が重要な関与をしているが[15]、糖尿病性腎症などの細小血管障害の成因にも重要な役割を果たしている[16]。血管内皮細胞の機能には、血管透過性の調節、血管内腔の抗血栓性、血管収縮・弛緩機能の調節、血液細胞との相互作用、細胞外マトリックスの合成、血管新生、血流に対する反応などが挙げられる[17]。高血糖状態ではこれら血管内皮機能の多くが障害される。糖尿病患者の血管内皮細胞では、抗凝固因子である TM や線溶因子である tPA の産生が低下し、線溶阻害因子である PAI-1 の産生が増加する。また、細胞接着分子である ICAM-1 や VCAM-1、内皮細胞由来血管収縮因子である ET-1 が増加する。さらに、内皮依存性の血管拡張能の低下が報告されているが、その分子機序として内皮型 NO 合成酵素である e-NOS の異常が指摘されている[15]。高血糖状態下における血管内皮細胞障害機序には、ポリオール代謝亢進、酸化ストレス亢進、終末糖化産物 (AGE) 生成、プロテインキナーゼ C (PKC) 活性異常などが関与している。

1.4 本研究の目的

前項までの背景を踏まえ、本研究では、糖尿病における血栓形成性の亢進を動物・細胞レベルで証明し、さらに糖尿病における血栓形成性の亢進と血管内皮遺伝子発現の関係を血行力学的応力依存性の観点から解析することを目的とした。

1.5 本論文の構成

本章では、本研究の背景と目的、本論文の構成について述べた。第2章では、糖尿病モデル動物における血栓形成性を検討した。第3章では、糖尿病患者における血小板凝集能を検討した。第4章では、培養血管内皮細胞に生体内血管レベルの圧力と剪断応力を同時負荷かつ独立制御可能な拍動性灌流装置を開発した。第5章では、本装置の有用

性を内皮細胞形態から検討した。第6章では、高血糖下で培養した内皮細胞における血栓形成関連遺伝子の発現に、生理的な応力負荷がどう影響するかを検討した。第7章では本研究の総括と展望を述べた。

参考文献

- [1] United Nations, Demographic Yearbook System, *Demographic Yearbook 2004*.
- [2] Grishko, V., Solomon, M., Breit, JF., Killilea, DW., Ledoux, SP., Wilson, GL., Gillespie, MN., Hypoxia promotes oxidative base modifications in the pulmonary artery endothelial cell VEGF gene, *The FASEBJ Journal*, Vol.15, No.7 (2001), pp.1267-1269.
- [3] Topper, JN., Cai, J., Falb, D., Gimbrone, MA., Jr., Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.93, No.19 (1996), pp.10417-10422.
- [4] 厚生労働省大臣官房統計情報部, 平成17年患者調査, 厚生労働省統計表データベース
- [5] 厚生労働省大臣官房統計情報部, 平成14年患者調査, 厚生労働省統計表データベース
- [6] 厚生労働省大臣官房統計情報部, 平成14年糖尿病実態調査, 厚生労働省統計表データベース
- [7] 厚生労働省大臣官房統計情報部, 平成9年糖尿病実態調査, 厚生労働省統計表データベース
- [8] Tschoepe, D., Driesch, E., Schwippert, B., Nieuwenhuis, HK., Gries, FA., Exposure of adhesion molecules on activated platelets in patients with newly diagnosed IDDM is not normalized by near-normoglycemia, *Diabetes*, Vol.44, No.8 (1995), pp.890-894.
- [9] Jilma, B., Fasching, P., Ruthner, C., Rumplmayr, A., Ruzicka, S., Kapiotis, S., Wagner, OF., Eichler, HG., Elevated circulating P-selectin in insulin dependent diabetes mellitus, *Thrombosis and Haemostasis*, Vol.76, No.35 (1996), pp.328-332.
- [10] Bridges, JM., Dalby, AM., Millar, JH., Weaver, JA., An effect of D -glucose on platelet

- stickness, *Lancet*, Vol.1 (1965), pp.75-77.
- [11] Hellem, AJ., Adenosine phosphate induced platelet adhesiveness in diabetes mellitus with complication. *Acta Medica Scandinavica*, Vol.190 (1971), pp.291-297.
- [12] Dittmar, S., Polanowska-Grabowska, R., Gear, AR., Platelet adhesion to collagen under flow conditions in diabetes mellitus, *Thrombosis Research*, Vol.74, No.3 (1994), pp. 273-283.
- [13] Kwaan, HC., Colwell, JA., Cruz, S., Suwanwela, N., Dobbie, JG., Increased platelet aggregation in diabetes mellitus. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol.80, No.2 (1972), pp.236-238.
- [14] Knobler, H., Savion, N., Shenkman, B., Kotev-Emeth, S., Varon, D., Shear-induced platelet adhesion and aggregation on subendothelium are increased in diabetic patients, *Thrombosis Research*, Vol.90, No.4 (1998), pp.181-190.
- [15] Cosentino, F., Lüscher, TF., Endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, Vol.32, Suppl 3 (1998), pp.S54-S61.
- [16] Stehouwer, CD., Endothelial dysfunction in diabetic nephropathy: state of the art and potential significance for non-diabetic renal disease, *Nephrol Dial Transplant*, Vol.19, No.4 (2004), pp.778-781.
- [17] Maruyama, I., Biology of endothelium, *Lupus*, Vol.7, Suppl 2 (1998), pp.S41-43.

第2章 糖尿病モデル動物を用いた血栓形成性の検討

2.1 緒言

第1章で述べたように、糖尿病における慢性高血糖状態は、種々の血管障害を引き起こし、血栓症の発症・進展に至る。糖尿病における血栓形成については現在までに様々な研究が成されてきた。*In vitro* における検討では、糖尿病モデルラットから採取した洗浄血小板の凝集能が亢進していたという報告や[1]-[4]、血漿内もしくは全血における血小板凝集能が亢進していないか、むしろ低かったという報告もある[2],[4]。これらの報告はいずれもアゴニスト惹起による血小板凝集能を検討しているが、剪断応力惹起による血小板凝集能の検討では、自然発症糖尿病ラットから採取した全血の凝集能が亢進していたという報告がある[5]。一方、*in vivo* における検討では、糖尿病モデル動物に血栓形成モデルを適用した報告は少なく、知見も様々である[2],[5]。実験動物を用いた血栓モデルの詳細は後述するが、その中でも、光化学反応刺激による血栓モデルは低浸襲で再現性が高い。また、同モデルは活性酸素の過剰産生を血栓形成の誘因とすることから、糖尿病性合併症の発症・進展因子として注目されている酸化ストレス亢進を考慮することができる。そこで本章では、糖尿病モデル動物に光化学反応刺激による血栓モデルを適用することで、糖尿病では本当に血栓が形成され易いのかを検討した。

2.2 試薬と方法

すべての実験は、国立病院機構埼玉病院生命倫理委員会規程における動物実験ガイドライン及び動物実験の手引きに基づいて実験を行った。

2.2.1 実験動物

7週齢の Wistar 系雄性ラット（日本チャールス・リバー）に、STZ 55 mg/kg（Sigma）

を生理食塩水 0.5 ml に溶解させ大腿静脈より単回投与し、3 週間後、糖尿病ラット群として使用した。対照群には、10 週齢の Wistar 系雄性ラットを使用し、糖尿病ラット群と週齢を合わせた。

2.2.2 光化学反応刺激による血栓モデル

光化学反応刺激による血栓モデルは、光照射した動脈が血栓形成によって閉塞する非侵襲の実験手法である[6],[7]。血栓形成は、光感受性物質に励起光を照射することで誘導される光化学反応によって開始される。この際、励起された光感受性物質は酸素分子に励起エネルギーを移すことで主に一重項酸素を生成する[8]。活性酸素は強い過酸化反応によって血小板や内皮細胞を障害し、その結果、血小板と血管内皮細胞の相互作用や血小板凝集を引き起す。

ラットにネブタール注射液(ペントバルビタールナトリウム 50 mg/ml, 大日本製薬) 1 ml/kgで腹腔内麻酔後、ポリエチレンカテーテルを大腿静脈から挿入し薬剤投与経路とした。下腹部を正中切開し、注意深く腸間膜ループを展開後、生体顕微鏡下に固定した。その際、呼吸運動や腸管蠕動運動による腸管の運動を最小限に抑えるため、生理食塩水で浸した脱脂綿で腸間膜を軽く固定した。実験中、腸間膜の乾燥を防ぐため 37 °Cの生理食塩水を随常時滴下し、生理状態を保った。周囲温度は常に 37 °Cに保った。Hematoporphyrin ether 5 mg/kg (以下フォトフリン; 励起波長: 540 nm, ワイス) を大腿静脈内カテーテルより投与し、30 分後に落射蛍光装置 (TE-FM, ニコン) を備えた正立顕微鏡に取り付けた水銀ランプ (C-SHG1, ニコン) を光源とし、励起フィルター (510–570 nm, ニコン) を介して対象血管に照射した。対象血管にのみ血栓を形成し、周囲の血管を障害しないように、光照射径は 100 μm になるように視野絞りにて調整した。また、光照射強度は、27 mW/mm^2 になるようにNDフィルターにて調整した。光照射は、対象血管が血栓で閉塞するまで継続した。本研究では、内径 20–30 μm の細動脈で分岐のないものを対象血管とした。

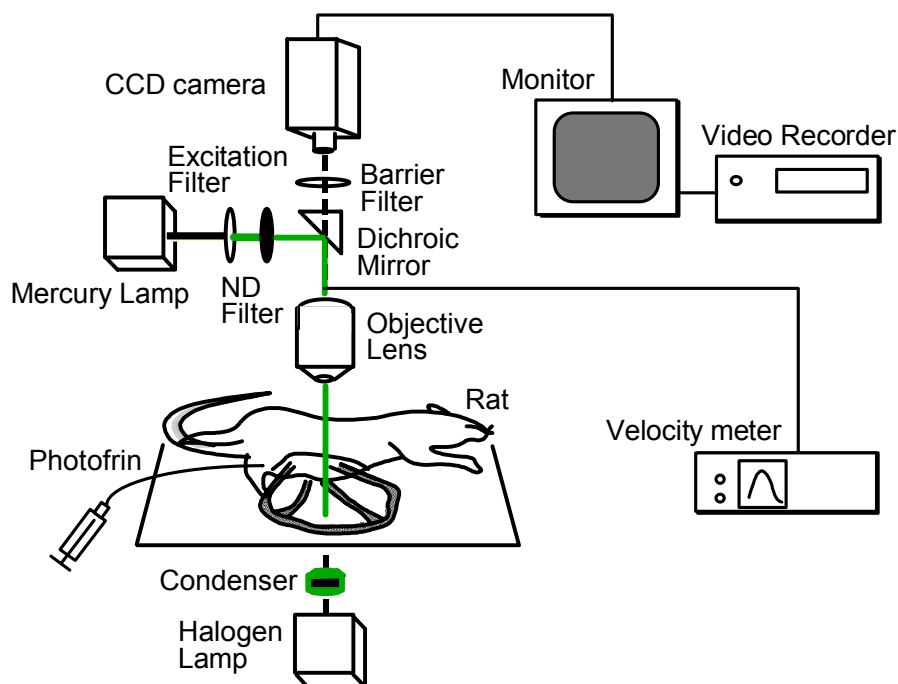


図 2.1 光化学反応刺激血栓モデルにおける実験装置概略図

2.2.3 血流計測と血栓形成評価

血流動態と血栓形成過程はハロゲンランプを搭載した透過型生体ビデオ顕微鏡下で40倍の対物レンズを通して観察した。対象血管における血流速度は、RBC Velocity Tracking Correlator (Model 102BC, Instrumentation for Physiology and Medicine) で解析した。血栓形成過程の評価には、以下の指標を用いた。対象血管に光照射を施行し始めてから対象血管壁に血小板が粘着し始める時間を血小板粘着開始時間 (T_i) と定義した。また、対象血管に光照射を施行し始めてから血栓形成によって対象血管が閉塞するまでの時間を血管閉塞時間 (T_o) と定義した。さらに、血管閉塞時間から血小板粘着開始時間を差し引いた時間を血栓成長時間 ($T_o - T_i$) と定義した。

2.2.4 電子顕微鏡観察

本血栓モデルにおいて正常ラットの腸間膜細動脈に血栓を形成した後、1時間以内に

手術用顕微鏡 (Zeiss) 下において閉塞した細動脈を注意深く取り出し、2 時間 2% グルタルアルデヒドに浸した。その後、0.1 mol/l リン酸緩衝液を用いて洗浄し、1 %オスミウム酸に 2 時間浸した。その後、超ミクロトームで薄片を作るために、一括して染色し、エタノールで脱水し、エポキシ樹脂で包埋した。厚い部分を血管の長軸に平行に切断し、トルイジンブルーで染色し、細動脈内の血栓の場所を突き止めるために光学顕微鏡で観察した。その後、0.5 μm の薄い部分を切り出し、酢酸ウラニルで染色し、クエン酸に浸し、透過電子顕微鏡 (JEM-1200EX, 日本電子) で観察した。

2.2.5 統計解析

測定値は全て平均±標準偏差で示した。また、実験動物における生理的パラメータおよび血栓モデルにおける血栓形成時間は、Mann-Whitney *U* 検定[9]を用いて解析した。

2.3 結果

2.3.1 生理的パラメータ

糖尿病ラットにおいて、有意な体重減少と血糖値およびHbA_{1c}の有意な増加が認められた (表 2.1)。HbA_{1c}は過去 3~4 週間の血糖濃度に依存する。しかし、糖尿病ラットにおけるフィブリノゲン、プロトロンビン時間[10]、アンチトロンビンⅢ[11]、活性化部分トロンボプラスチン時間[12]は、正常ラットと比較して有意な差は認められなかった。ここで、フィブリノゲンは血液凝固因子である。また、プロトロンビン時間は外因性の凝固活性を、アンチトロンビンⅢは凝固抑制を、活性化部分トロンボプラスチン時間は内因性の凝固活性を測定する検査である。よって、本実験で用いた糖尿病ラットでは凝固系の異常は生じていないことが示された。

光照射前における血流速度、血管径および剪断速度は、正常ラットと糖尿病ラットの細動脈で有意な違いは認められなかった (表 2.2)。

表 2.1 正常ラットおよび糖尿病ラットにおける体重と血液化学検査

	正常ラット	糖尿病ラット
動物数	15	14
体重 (g)	274 ± 17	163 ± 14**
血糖値 (mg/dl)	112 ± 13	530 ± 43**
HbA _{1c} (%)	3.0 ± 0.2	6.5 ± 0.6**
フィブリノゲン (mmol/l)	6.7 ± 1.5	6.6 ± 2.0
プロトロンビン時間 (s)	43.9 ± 10.1	43.0 ± 10.1
アンチトロンビンⅢ (%)	82.9 ± 16.0	79.8 ± 10.6
活性化部分トロンボプラスチン時間 (s)	58.5 ± 18.1	63.6 ± 17.3

** $p < 0.01$ vs. 正常ラット

表 2.2 正常ラットおよび糖尿病ラットの細動脈における血管径, 血流速度, 剪断速度

	正常ラット細動脈	糖尿病ラット細動脈
血管数	49	42
血管径 (μm)	25.3 ± 3.0	25.9 ± 2.2
血流速度 (mm/s)	4.2 ± 0.9	4.3 ± 1.6
剪断速度 (s^{-1})	1337.1 ± 351.4	1358.1 ± 529.9

2.3.2 糖尿病モデル動物における血栓形成性の亢進

5mg/kgフォトフリン投与のみ, もしくは 27 mW/mm²の継続した光照射のみのどちらかを施行した状態において血流動態を1時間観察した. その結果, 血管収縮や血栓形成に起因する血流動態の変化は認められなかった. フォトフリン投与後, 継続的な光照射の施行に伴い, 光照射をした細動脈壁に血小板が粘着し, 徐々に凝集が起これり, 最終的に閉塞した (図 2.2). 電子顕微鏡解析では, 血栓は白血球や赤血球ではなく, 血小板だ

けで構成されており、脱顆粒した血小板と脱顆粒していない血小板の両方が混在していた。フィブリン塊は血栓内に観察されず、光照射した血管内皮細胞の剥離や形態変化もなかった (図 2.3)。本血栓モデルにおいては、糖尿病ラット細動脈における血小板粘着開始時間 (T_i)、血管閉塞時間 (T_o)、血栓成長時間 ($T_o - T_i$) の全てが、正常ラット細動脈に比し、有意に減少していた (図 2.4)。即ち、糖尿病ラットでは血小板の血管壁への粘着開始、血栓の成長、血管の閉塞が正常ラットよりも早くなることが示された。

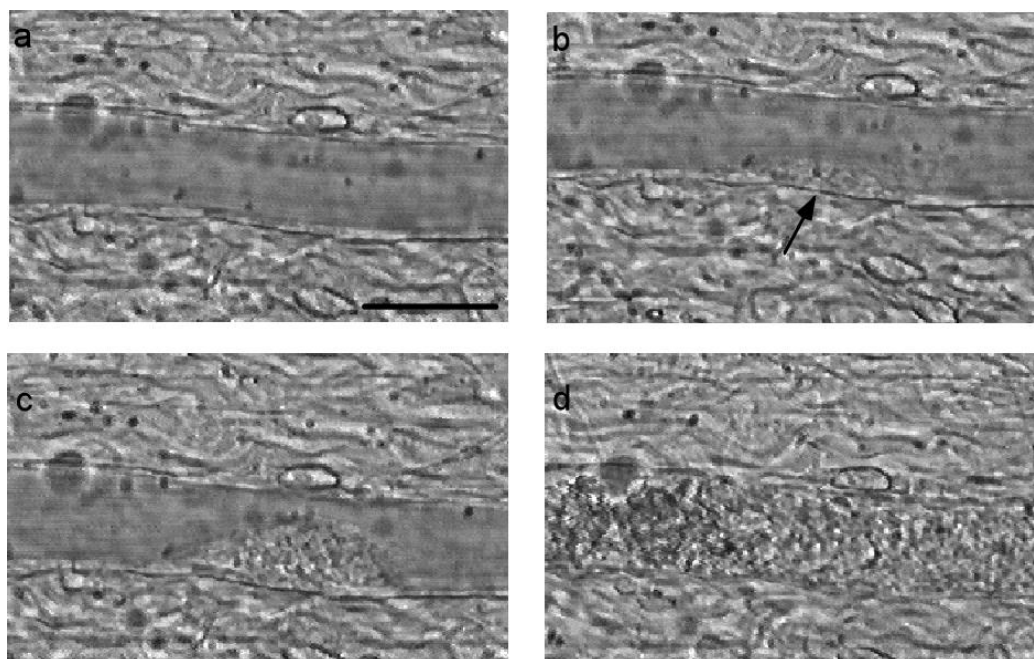


図 2.2 光化学反応刺激血栓モデルを施行した正常ラット腸間膜細動脈における血栓形成過程

血流方向は左から右、スケールバーは 50 μm ,

a) 光照射前, b) 血小板粘着と凝集 (矢印), c) 血栓成長段階, d) 血管閉塞

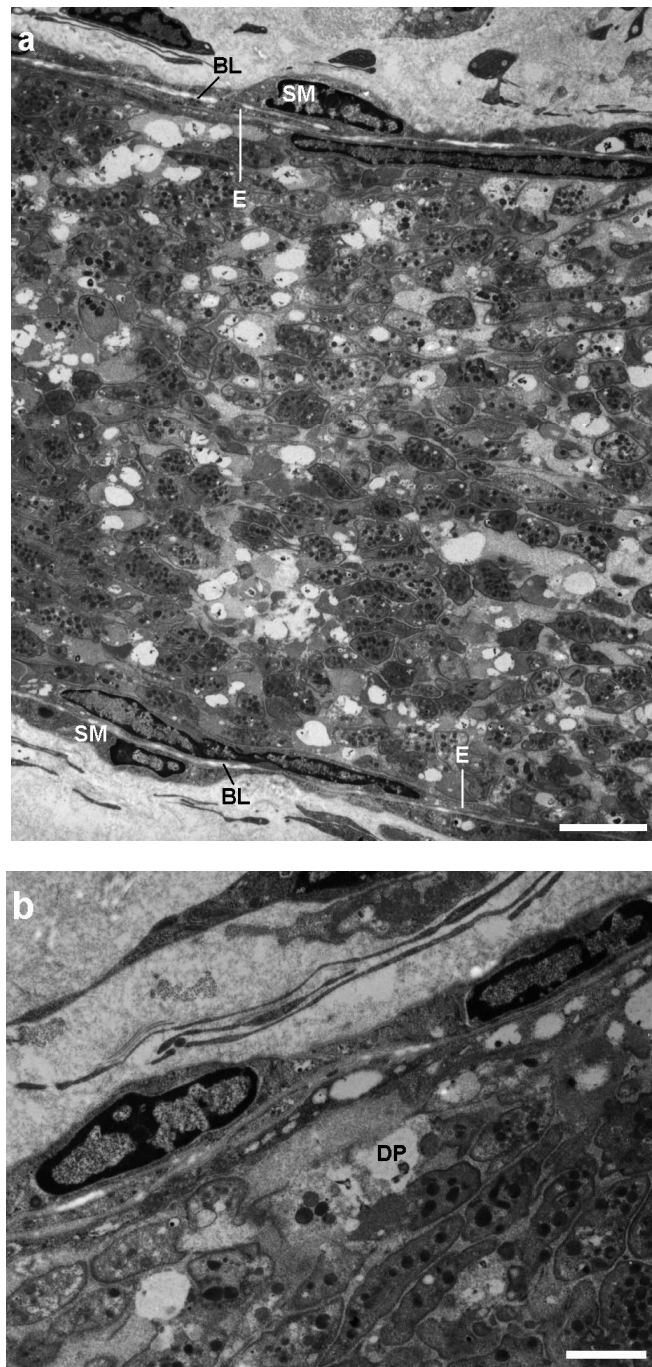


図 2.3 血栓形成により閉塞した正常ラット腸間膜細動脈における電子顕微鏡画像

a) スケールバーは 5 μm , E : 血管内皮細胞, BL : 基底膜, SM : 平滑筋,

b) スケールバーは 2 μm , DP : 血小板脱顆粒

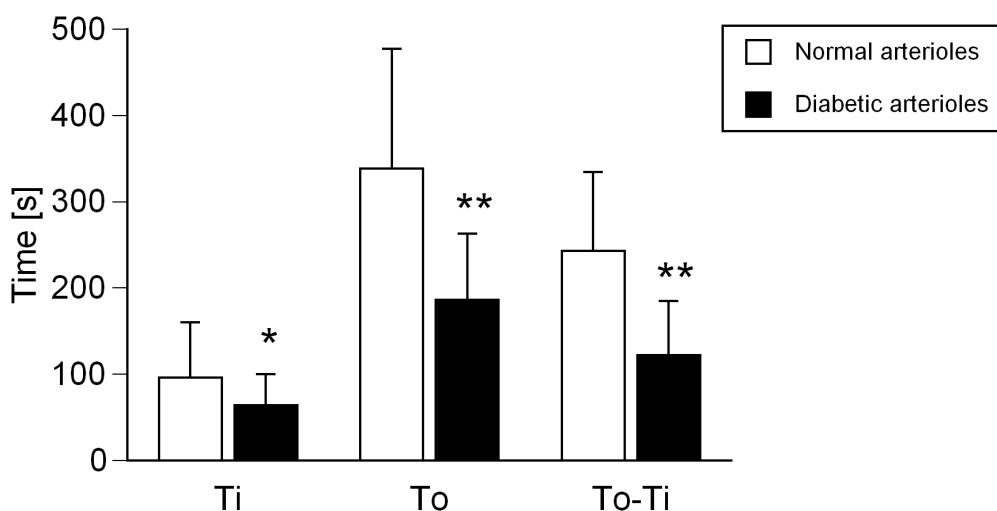


図 2.4 正常ラットおよび糖尿病ラットの細動脈における血栓形成時間

Ti : 血小板粘着開始時間, To : 血管閉塞時間, To-Ti, 血栓成長時間

** : $p < 0.01$ vs. normal arterioles, * : $p < 0.05$ vs. diabetic arterioles

2.4 考察 - 血栓形成における血小板と血管内皮細胞の関与 -

まず、本モデルにおける血栓部位の電顕鏡画像から、本モデルで形成される血栓は、血管内皮細胞が剥離していない血小板血栓であることが示された。また、血栓におけるフィブリン塊も観察されなかった。このことから、血栓形成過程の指標とした血小板粘着開始時間 (T_i) と血栓成長時間 ($To-T_i$) は次のような臨床的意義を持っていると考えられる。血小板粘着開始時間 (T_i) は、血小板と血管内皮細胞との相互作用に関与する指標であると考えられる。また、血栓成長時間 ($To-T_i$) は、血小板凝集能の関与する指標であると考えられる。次に、本モデルでは、正常ラット細動脈に比し、糖尿病ラット細動脈において血小板粘着開始時間 (T_i) および血栓成長時間 ($To-T_i$) が有意に短縮することを示した。よって、本モデルにおける糖尿病ラットの血栓形成性の亢進には、血管内皮機能障害および血小板機能異常が関与していると考えられる。

糖尿病患者では、高血糖によって血管内皮機能障害が誘発される[13]。その障害機序は、1.3.3 で前述した通り、ポリオール代謝亢進、酸化ストレス亢進、AGE、PKC活性異常などの代謝異常が関与している。そしてその血管内皮機能障害が大血管障害や細小

血管障害の発症や進展に重要な役割を果たしている[14]。また、糖尿病における血管内皮機能障害機序は酸化ストレス亢進の観点から検討されてきた[15],[16]。STZ誘発糖尿病ラットにおいて血管におけるNOの生物学的利用能は減少し、血管におけるO₂産生は増加する[17]。さらに、SODや抗酸化物質による処置は糖尿病ラット[18]-[20]や糖尿病患者[21],[22]における血管内皮依存性の弛緩を改善する。これらの研究は糖尿病における血管内皮機能障害における酸化ストレス亢進の関与を支持するものである。よって、本モデルにおいて糖尿病ラットにおける血栓形成性の亢進には、酸化ストレス亢進によって誘導された血管内皮機能障害に起因すると考えられる。

2.5 結言

本章では、光化学反応刺激による血栓モデルを用いて、糖尿病ラットにおける血栓形成性の亢進を示した。また、本モデルで形成される血栓が血管内皮非剥離型血小板血栓であることから、糖尿病における血栓形成性の亢進には血小板機能異常と血管内皮機能障害が重要因子であることが示された。次章以降では、血小板と血管内皮細胞を生体内という外乱が多数ある実験環境から、限られた実験環境の中で必要な実験条件のみを操作可能な生体外または培養系で個別に検討を進めた。そこで次章では、糖尿病における血栓形成性亢進の重要因子の一つである血小板に着目し、糖尿病患者における血小板凝集能測定を行った。

参考文献

- [1] Hara, T., Nakamura, J., Koh, N., Sakakibara, F., Hamada, Y., Sasaki, H., Naruse, K., Nakashima, E., Takeuchi, N., Inukai, S., et al., An aldose reductase inhibitor, TAT, reduces ADP-induced platelet hyperaggregation in streptozotocin-induced diabetic rats with neuropathy, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol.126, No.6 (1995), pp.541-547.
- [2] Takiguchi, Y., Wada, K., Matsuno, H., Nakashima, M., Effect of diabetes on photochemically induced thrombosis in femoral artery and platelet aggregation in rats, *Thrombosis Research*, Vol.63, No.4 (1991), pp.445-456.

- [3] Winocour, PD., Kinlough-Rathbone, RL., Mustard, JF., Pathways responsible for platelet hypersensitivity in rats with diabetes. I. Streptozocin-induced diabetes, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol.107, No.2 (1986), pp.148-153.
- [4] Eldor, A., Merin, S., Bar-On, H., The effect of streptozotocin diabetes on platelet function in rats, *Thrombosis Research*, Vol.13, No.5 (1978), pp.703-714.
- [5] Taka, T., Ono, H., Sasaki, Y., Seki, J., Yamamoto, J., Platelet reactivity in spontaneously diabetic rats is independent from blood glucose and insulin levels, *Platelets*, Vol.13, No.5-6 (2002), pp.313-316.
- [6] Saniabadi, AR., A Novel Photochemical Model for Thrombosis Research and Evaluation of Antithrombotic and Thrombolytic Agents, Edited by Nakashima, M., *Churchill Livingstone*, (1994), pp.1-19.
- [7] Ishikawa, M., Sekizuka, E., Oshio, C., Sato, S., Yamaguchi, N., Terao, S., Tsukada, K., Minamitani, H., Kawase, T., Platelet adhesion and arteriolar dilation in the photothrombosis: observation with the rat closed cranial and spinal windows. *Journal of the Neurological Sciences*, Vol.194, No.1 (2002), pp.59-69.
- [8] Saniabadi, AR., Photosensitisers and photochemical reactions. In: A Novel Photochemical Model for Thrombosis Research and Evaluation of Antithrombotic and Thrombolytic Agents. Nakashima M, ed. *Churchill Livingstone*, (1994), pp.1-19.
- [9] 縣俊彦, 基本医学統計学EBM・医学研究への応用, (1999), 89-90 頁, 中外医学社.
- [10] 金井泉著, 金井正光編, 臨床検査法提要, (1993), 416-418 頁, 金原出版.
- [11] 金井泉著, 金井正光編, 臨床検査法提要, (1993), 444-446 頁, 金原出版.
- [12] 金井泉著, 金井正光編, 臨床検査法提要, (1993), 414-416 頁, 金原出版.
- [13] Ting, HH., Timimi, FK., Boles, KS., Creager, SJ., Ganz, P., Creager, MA., Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.97, No.1 (1996), pp.22-28,
- [14] Cosentino, F., Lüscher, TF., Endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, Vol.32, Suppl 3 (1998), pp.S54-S61.
- [15] Giugliano, D., Ceriello, A., Paolisso, G., Oxidative stress and diabetic vascular complications, *Diabetes Care*, Vol.19, No.3 (1996), pp.257-267.

- [16] Tesfamariam, B., Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction, *Free Radical Biology and Medicine*, Vol.16, No.3 (1994), pp.383-391.
- [17] Hink, U., Li, H., Mollnau, H., Oelze, M., Matheis, E., Hartmann, M., Skatchkov, M., Thaiss, F., Stahl, RA., Warnholtz, A., Meinertz, T., Griendling, K., Harrison, DG, Forstermann, U., Munzel, T., Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus, *Circulation Research*, Vol.88, No.2 (2001), E14-E22.
- [18] Pieper, GM., Moore-Hilton, G, Roza, AM., Evaluation of the mechanism of endothelial dysfunction in the genetically-diabetic BB rat, *Life Sciences*, Vol.58, No.9 (1996), PL147-PL52.
- [19] Keegan, A., Walbank, H., Cotter, MA., Cameron, NE., Chronic vitamin E treatment prevents defective endothelium-dependent relaxation in diabetic rat aorta, *Diabetologia*, Vol 38, No.12, (1995), pp.1475-1478.
- [20] Vallejo, S., Angulo, J., Peiró, C., Sánchez-Ferrer, A., Cercas, E., Llergo, JL., Prevention of endothelial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats by gliclazide treatment, *Journal of Diabetes and its Complications*, Vol.14, No.4, (2000), pp.224-233.
- [21] De Mattia, G, Laurenti, O., Fava, D., Diabetic endothelial dysfunction: effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients, *Journal of Diabetes and its Complications*, Vol.17, No.2, Suppl 1 (2003), pp.30-35.
- [22] Timimi, FK., Ting, HH., Haley, EA., Roddy, MA., Ganz, P., Creager, MA., Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus, *Journal of the American College of Cardiology*, Vol.31, No.3, (1998), pp.552-557.

第3章 糖尿病患者における血栓形成性の検討

3.1 緒言

現在、わが国における糖尿病患者およびその予備軍の人口は年々増加の一途をたどっており、様々な血管合併症が社会的な問題となっている。糖尿病における慢性的な高血糖状態は、二次的変化として、赤血球変形能の低下や血小板凝集能の亢進、血液粘度の上昇など様々な血液レオロジー異常を引き起こす。このような異常が糖尿病性血管合併症の発症・進展を誘発する機序の多くは毛細血管や細小血管を有する微小循環の異常に起因するが、その中でも血小板凝集能の亢進は、血管内において病的な血栓の形成を誘発させるため、網膜症や心筋梗塞、脳梗塞などの血栓性合併症に密接に関与している。よって、糖尿病患者における血栓性合併症の発症・進展を予防するためにも、早期の血小板凝集能亢進の検知が大変重要である。また、微小循環レベルでの血小板凝集能の亢進を検知するためには、僅かな血小板の活性化や毛細血管や細小血管で観察されるような微小な凝集塊を検出する必要がある。血小板凝集能測定とは、血液から単離した血小板浮遊液に、血小板を活性化させ血小板同士の凝集を惹起する作動薬（アゴニスト）を添加し、凝集程度を評価する検査である。現在、臨床検査の項目でもある血小板凝集能測定は、1962年、Bornらにより開発された透過光法による測定が広く応用されている[1]-[3]。しかし、透過光法においては、透過率に変化が生じるのが比較的大きな凝集塊が生じてからであるために、微小凝集塊の検出精度が低下するという欠点がある[4]-[7]。また、実際の生体内では、大凝集塊を形成させるような強い血小板凝集惹起物質が放出されることは少ない事からも、より低濃度の血小板凝集惹起物質により形成された微小凝集塊の検出精度の向上が求められる。そこで透過光法の欠点を改善すべく、光散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定が考案された[8],[9]。現在、光散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定は研究用途で使われており、臨床応用に向けた標準化や適切な評価法は未だ確立されていない。糖尿病患者における光散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定はいくつか報告があるが、すべての糖尿病患者において健常者と有意な差が認

められているわけではない[10]-[13]。そこで本章では、レーザ散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定の新しい解析法を提案することで、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進をより高精度に検出することを目的とした。

3.2 血小板凝集

3.2.1 アゴニスト惹起血小板凝集

糖尿病などの血栓形成性疾患においては、生体内において血小板が活性化され易い状態になっていると考えられている。よってこのような疾患における血小板機能を正確に測定することは、病態の把握、治療効果の判定において大変重要である。血小板機能検査には血小板粘着能、顆粒放出能、血小板凝集能などがあるが、最も普及しているのは血小板凝集能である。それは、血小板凝集が血小板粘着や顆粒放出といった反応を経て起こるため、血小板凝集能を測定することで他の血小板機能のある程度予測することが可能であるという背景もある。血小板凝集能を測定するためには、血小板を活性化させる必要があり、コラーゲン、ADP、エピネフリンなどの生理的なアゴニストが一般的に用いられる。通常、血管の内側は血管内皮細胞に覆われており、血小板が血管内皮細胞に接着することはない。しかし、血管内皮細胞が傷害され、血管内皮下組織が露出されると、血流中の血小板がこの損傷部位に粘着し、直ちに凝集塊を形成して血管からの出血を防ぐ。これらの反応に関与するのが血管内皮下組織の主要な成分であるコラーゲンであり、傷害された内皮から放出されるADPである。また、血小板自身も自らを強く活性化するTXA₂を産生したり、ADPを放出したりすることにより、短時間でより多くの血小板を活性化できるようになっている。このように、血小板が活性化されるまでの経路は複数あり、血管傷害部位において速やかに血栓を形成し止血する機構が備わっている。アゴニスト惹起血小板凝集の程度を評価する方法はこれまでに多数考案されており、血小板凝集の程度を透過光で評価する透過光法、白金電極間の電気抵抗の変化として捕らえるインピーダンス法[14]、コールターカウンタを用いて血小板凝集に関与しない単一血小板の数から血小板凝集の程度を推定する粒子算定法[15]などがある。最近では、散乱光を用いた血小板凝集能測定[8],[9]、フィルターを用いた全血血小板凝集能測

定[16]も考案されたが、最も臨床において普及しているのは透過光法を用いた血小板凝集能測定[1]-[3]である。

3.2.2 剪断応力惹起血小板凝集

血小板を高剪断速度の条件に暴露すると、血小板活性化物質が存在しなくても血小板凝集が惹起される。ADP などのアゴニストを用いた場合、血小板活性化に伴い高次構造の変化した血小板膜糖タンパク質である GPIIb/IIIa が血漿中の粘着タンパク質であるフィブリノゲンを介して結合することにより血小板同士の凝集が生じる。一方、剪断応力惹起血小板凝集の機序はアゴニスト惹起血小板凝集とは異なり、血小板膜糖タンパク質の GPIb と GPIIb/IIIa が、血漿中の粘着タンパク質の vWF が関与している。剪断応力によって血小板凝集を惹起させる方法として、検体に一樣の剪断応力を負荷することが可能な円錐平板回転粘度計が用いられる[17]。検体は、回転する円錐と固定した平板の間に置かれる。PRP や洗浄血小板を用いた実験では、同方法を用いることで血小板凝集が惹起されることが報告されている[17]。同方法は、円錐が回転することで検体に剪断応力が負荷される原理であるが、平板上に固定した血管内皮細胞が受ける剪断応力とは異なり、検体の受ける剪断応力はあくまで流体が受ける剪断応力であって、検体中を浮遊する血小板の膜表面が受ける剪断応力ではないことを理解する必要がある[18]。また、剪断応力惹起血小板凝集を評価する方法としては、剪断応力負荷前後の血小板数を計測する方法や[19]、透過光法によって計測する方法がある[20]。しかし、これらの実験系や評価系は、研究レベルでは優れているが、臨床における検査装置としては標準化などの課題があり、実用化には至っていない。

3.3 血小板凝集能測定

3.3.1 透過光法

1962 年、Born により開発された透過光法が、現在最も標準的な血小板凝集能測定法として用いられている[1]。測定原理としては、血小板の存在により混濁している血小

板浮遊液の光透過性が、血小板の凝集に伴い増加する現象を用いている。同測定法は簡便かつ短時間で測定できることから、多くの施設で使用され、これまでに広く臨床に応用されてきた。採血から測定までの手順としては、まず採血した血液を遠心分離し、PRPを取り出す。PRPはほとんど赤血球や白血球を含まず、血小板と血漿のみで構成され、白く混濁している。通常、20–30万/ μl に血小板数を調整したPRPを円柱状の試験管に入れ、金属攪拌棒で攪拌しながらアゴニストを加える。その後、凝集に伴い増加するPRPの光透過性を、PPPを対照として分光光度計で計測する。低濃度のアゴニストを用いた場合、PRPの光透過性は数%から数10%増加し、数分で再び元のレベルに近づく。この光透過性の変化は、血小板が一時的に凝集しその後凝集塊が解離する現象を反映しており、この現象を一次凝集と呼ぶ。また、より高濃度のアゴニストで血小板を刺激すると、一次凝集に引き続きより光透過性が増加する非解離性の二次凝集が生じる。透過光法では、血小板凝集程度を表す光透過性の評価法として、透過光変化率の最大値や血小板凝集曲線の最大変化率などが用いられているが、最も広く行われている評価法は、低濃度から高濃度に至る2, 3種類の濃度を用意し、二次凝集を起こす濃度でパターンを判定する方法である[21]。高濃度のアゴニストを用いても二次凝集が惹起されない場合は血小板凝集能の低下と判定し、低濃度のアゴニストでも二次凝集が惹起される場合は血小板凝集能の亢進と判定する。しかし、血小板凝集能の変化が著名なときはこのようなパターン判定の適用が可能であるが、大部分の患者は血小板凝集能が軽度に亢進しているのみであり、この評価法で血小板凝集能を定量化することは困難である。この欠点を克服して凝集率に定量性を持たせたのがGrading curve法である[22]。同評価法は、4, 5種類の濃度を用いそれぞれの最大凝集率を求めた後、最も強い最大凝集率の50%凝集を引き起すアゴニスト濃度を推定する方法であり、各検体について一つの評価値が求められるという点で数量化に優れ、また再現性も良い方法である。同評価法は、透過光法を用いて血小板凝集能を評価する際、最も良い方法と考えられるが、1検体当たりの測定回数が多く、あまり普及していない。一方、透過光法は現在も最も汎用されている方法だが、その欠点も指摘されている。第一に、血小板数が10万/ μl 以下のPRPでは、対照に使うPPPとPRPとの光透過性の差が少なく計測できない。第二に、高脂血症などにより混濁した乳白色の乳び血漿では、その混濁により血小板凝集後の光透過性の変化が本来よりも小さくなる。第三に、小凝集塊の検出ができず、ある程度の凝集が

惹起されないと光透過性に変化が現れない。透過光法では、血小板が数個から数百個程度で形成された凝集塊では検出できず、凝集塊同士がさらに凝集して血小板数が数千個から数万個程度で形成された凝集塊でようやく光透過性に変化が生じてくることが理論的にも実験的にも確かめられている[5]。このような理由により、血小板活性化状態と光透過性変化の相関があまり良くなく、また軽度の血小板活性化の検出感度が低いという欠点が生じてくる。透過光法による血小板凝集能測定は、血小板機能低下、特に先天性血小板機能異常症の診断には有効であり、何種類かのアゴニストを用いることによりかなりの確に血小板機能低下症を診断することが可能である。一方、糖尿病や高脂血症など血小板機能亢進が動脈硬化や血栓形成傾向に関与していると思われる疾患において、透過光法では血小板機能を的確に判断、評価することが困難であるという指摘もある。

3.3.2 散乱光法

血小板より大きなサイズの粒子からの散乱光は、粒子径の2乗に比例し増加する。この原理はフローサイトメーターで使用され、リンパ球、単球、赤血球などをそのサイズで分別できることが分かっている[23],[24]。この原理を用いて血小板凝集能の測定を行うのが散乱光法である。検体としては透過光法と同様に PRP を用いる。PRP を円柱状の試験管に入れ、金属攪拌棒により攪拌しながらアゴニストを加え、血小板凝集塊を形成させる。透過光法では、試験管の中央に赤外線を照射し反対側に抜ける透過光を測定するのに対し、散乱光法は、約 50 μm に収束した半導体レーザ光を試験管の内壁近傍に照射して側方より散乱光を検出する。血小板浮遊液中の血小板凝集塊から発生する散乱光は、周囲に血小板が存在するため多重散乱を受け検出器に到達する前に散乱強度が減少してしまう。そこで顕微鏡の対物レンズを応用した光学系により、光束の当たる部分に存在する血小板凝集塊からの散乱光強度を測定する。血小板凝集の結果は、散乱光強度をその頻度で乗じたものを積算して示す。一般的には 100 個以下の小凝集塊からの散乱光強度と、それ以上の大きさの凝集塊からの散乱光強度の 2 種に分けて判定することが多い。同測定法は、血小板凝集塊の数とその大きさを定量的に測定でき[8]、5、6 個程度の血小板より形成される小凝集塊から、数万個の血小板より形成される大凝集塊ま

で検出可能である。これは、凝集早期の軽度の血小板活性化のみが判定できるコールターを用いた粒子算定法の利点[15]と、凝集後期の大凝集塊の形成のみが評価できる透過光法[1]やインピーダンス法エラー! 参照元が見つかりません。の利点を兼ね備えていることになる。透過光法との相関をみると、高濃度のアゴニストにより大凝集塊が形成されるときは、散乱光法と透過光法はかなり良く合致する。しかし、低濃度のアゴニストを使用した場合、散乱光法は小凝集塊の形成を検出できるが透過光法では変化を認めないことが多く、解離が生じる。低濃度のアゴニストによる軽度の血小板活性化では、散乱光法はコールターなどによる粒子算定法との相関が良い。また、透過光法と異なり、高脂血症などで認められる乳び血漿の症例、また、血小板数が約 3 万/ μl 程度の血小板減少症例でも血小板凝集能が測定可能である（血小板数が少ないと散乱光強度も低下するため、健常人の血小板数を等しくした対照を作成する必要がある）。散乱光を用いた血小板凝集能の評価はまだ基準値が決定されていないことより、各施設で健常人の検体を測定しながら患者の検体の判定しているのが現状である。現在までに糖尿病などにおける血小板活性化を鋭敏に検出できることが報告され徐々に多くの施設より臨床検体測定がされるようになってきている。また、散乱光法の場合、アゴニストを加えることなく小凝集塊の形成が認められることがあり（自然凝集）、血栓形成性疾患で有意に更新していることが報告されており、鋭敏な血小板機能亢進状態の指標として期待されている[11],[25].

3.4 試料と方法

3.4.1 レーザ散乱粒子計測法による血小板凝集能測定

本研究では、図 3.1 に示したようなレーザ散乱粒子計測装置（以下 LSPA）を用いた。LSPA は、低剪断速度で流動する血小板浮遊液にレーザ光を照射し、得られる側方散乱光強度から凝集塊の大きさと数を定量的に評価する。レーザ光には半導体レーザ（波長 675 nm）の近赤外光を用いている。そして集光レンズを用いて、照射径約 40 μm 程度にまで絞られ試料に照射される。試料は、専用の外径 7 mm、高さ 50 mm の円柱状のガラスキュベット（glass cuvette）に入れて実験を行なう。キュベットはインキュベーター（incubator）を用いて生体

内と条件が等しくなるように $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$) に保温されている。また測定中はキュベット内の金属攪拌棒が 1000 rpm で回転しており、試料を攪拌する。レーザ光は、キュベットの内壁より約 1 mm の近傍に照射され、2箇所測定領域 ($20\times 60\times 140\text{ }\mu\text{m}$) より入射光の光軸に対して 90° 方向の散乱光を対物レンズにて集光し、2つのフォトダイオードにより散乱光強度を電圧として $100\text{ }\mu\text{s}$ 毎に検出する。その際、未凝集の血小板からの散乱光は差動増幅器により雑音として除去され、凝集塊からの散乱光のみが絶対値回路と AD コンバーターを経てパソコンに電圧値として記録される (図 3.2)。

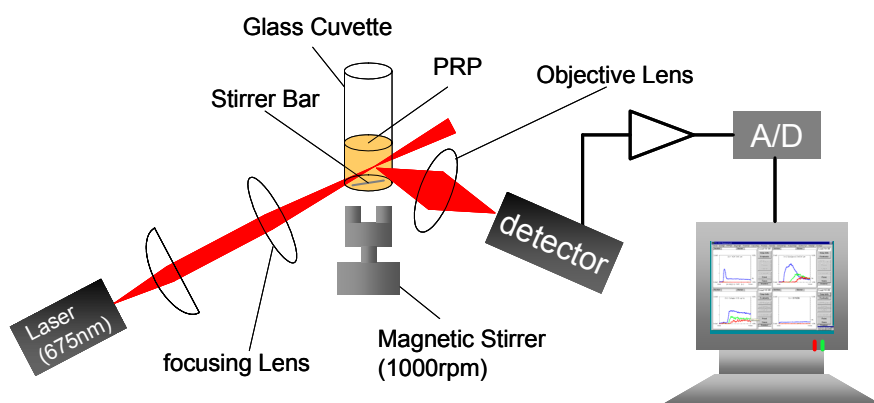


図 3.1 レーザ散乱粒子計測装置 (LSPA) 概略図

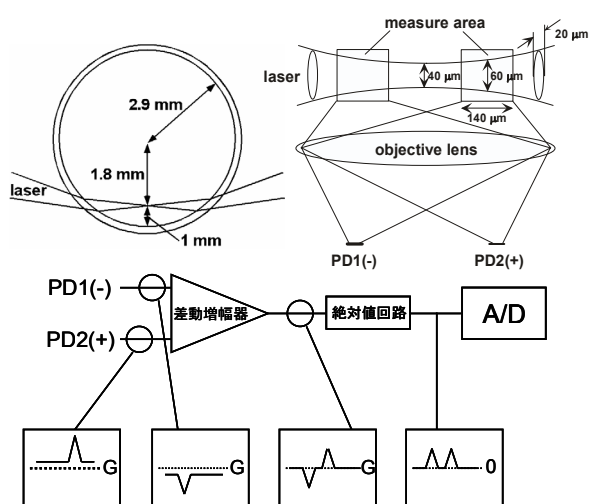


図 3.2 血小板凝集塊からの散乱光の検出方法

3.4.2 データ解析

電圧値として記録された散乱光強度は、1 から 32 の閾値によりレベル分けされ（図 3.3）、各閾値における検出回数（図 3.3 のピーク数）を時系列で解析可能である（図 3.4）。閾値 2 から 21 までを小凝集塊（S 領域）、閾値 22 から 27 までを中凝集塊（M 領域）、閾値 28 から 31 までを大凝集塊（L 領域）とし、各領域内で検出された散乱光強度の総和（総散乱光強度）の時系列変化を凝集曲線として解析可能である（図 3.5）。ここで、閾値 L を (3.1) 式に、S, M, L の各領域の総散乱光強度を (3.2) 式より定義した。散乱光強度 I は粒子径の 2 乗に比例することから、閾値 L は粒子径に対して線形性を示し、検出された凝集塊の大きさを表す指標となる。よって LSPA を用いた血小板凝集能測定では、凝集能は各領域の総散乱光強度で定義され、凝集塊の大きさと個数を反映する。なお、凝集していない単一血小板からの微弱な散乱光強度（閾値 1 以下）と出力電圧が飽和に達した散乱光強度（閾値 32 以上）は解析データに含めなかった。

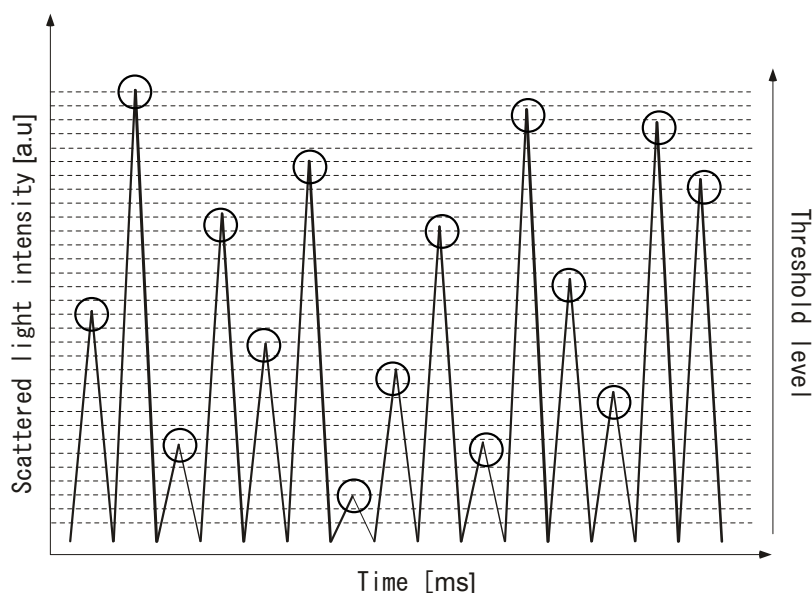


図 3.3 LSPA を用いて検出された散乱光強度から変換された電気信号のイメージ図

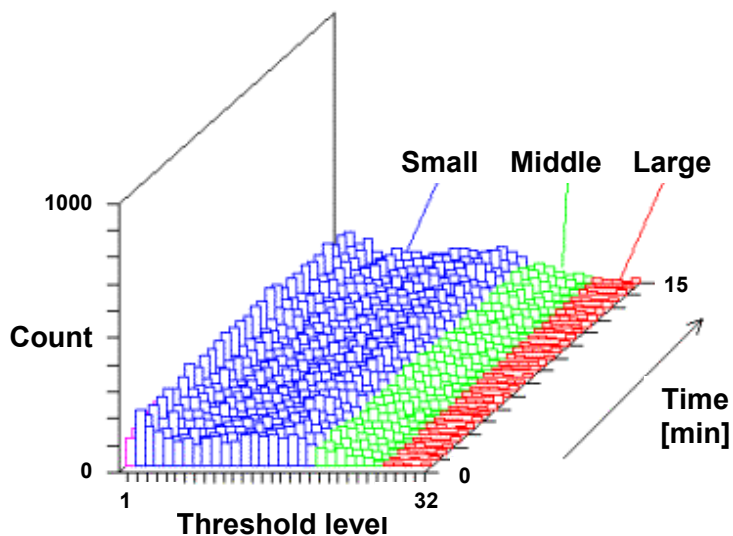


図 3.4 閾値別血小板凝集塊における検出回数の時系列変化

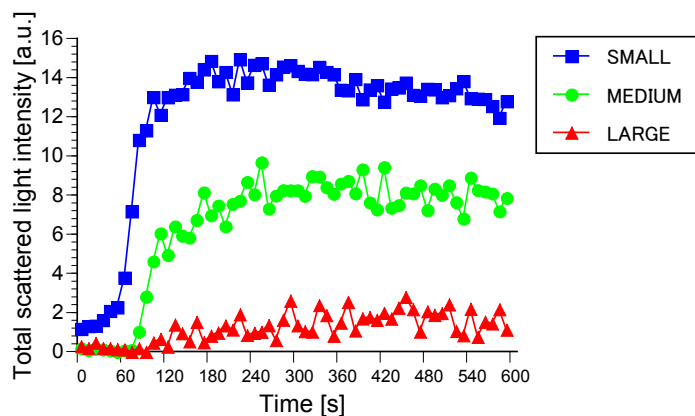


図 3.5 小, 中, 大凝集塊における血小板凝集曲線

$$L = 16.1 \times \log_{10} I - 20.6$$

$$L: \text{Threshold level } 1 \leq L \leq 32, I: \text{Scattered light intensity} \quad (3.1)$$

$$\text{各領域の総散乱光強度} = \text{各領域の閾値 } L \text{ (散乱光強度 } I) \times \text{検出回数} \quad (3.2)$$

3.4.3 血小板の前処理

国立病院機構埼玉病院倫理委員会において承認を得ているインフォームドコンセントの下、30人（健常者15人、抗血小板薬を服用していない2型糖尿病患者15人）のボランティアに本実験で使用する血液を提供してもらった。あらかじめ全血液の1/10体積量の3.8%クエン酸を入れたポリプロピレンチューブに肘正中静脈から採血した血液を収集した。PRPはクエン酸採血で収集した血液試料を室温で120gで10分間遠心分離して得た。PRPを取り除いた血液試料をさらに1500gで遠心分離したものを貧血小板血漿PPPとして用いた。PRPはPPPで希釈し、血小板数300,000 cells/ μ lに調整した。健常者の血液から作成した調整PRPを正常血小板、糖尿病患者の血液から作成した調整PRPを糖尿病血小板とした。

3.4.4 実験プロトコール

測定時間は10分間とし、キュベット内の金属攪拌棒の攪拌だけで血小板凝集を惹起させる実験（自然凝集）と、低濃度の血小板凝集惹起物質（終濃度ADP 0.5 μ M, エピネフリン 0.3 μ M, コラーゲン 1.0 μ g/ml）を用いた実験を行った。血小板凝集惹起物質は、測定開始1分後に調整PRPに添加した。得られた測定データから血小板凝集能を二通りの解析法で評価した。1) 測定開始から10分間のS領域における総散乱光強度を求めた。これは、小凝集塊生成後の血小板凝集能を表す。2) 測定開始1分後から3分後までの2分間のS領域における総散乱光強度（自然凝集以外）を求めた。これは、血小板の活性化から小凝集塊生成初期の血小板凝集能を表す。

3.4.5 統計解析

凝集能解析のデータは平均値±標準偏差で表し、健常者および糖尿病患者の血小板凝集能における有意差検定にはSteel検定[26]を用いた。

3.5 結果

3.5.1 自然凝集

健常者および糖尿病患者におけるキュベット内の金属攪拌棒の攪拌だけで血小板凝集を惹起した際に得られた凝集曲線の典型的な一例を図 3.6 に示した。健常者においては小凝集塊の形成はほとんど認められなかったが（図 3.6 a），糖尿病患者においては，小凝集塊の形成が明らかに認められた患者と（図 3.6 b），健常者と同様，僅かな形成しか認められなかった患者とが存在した。

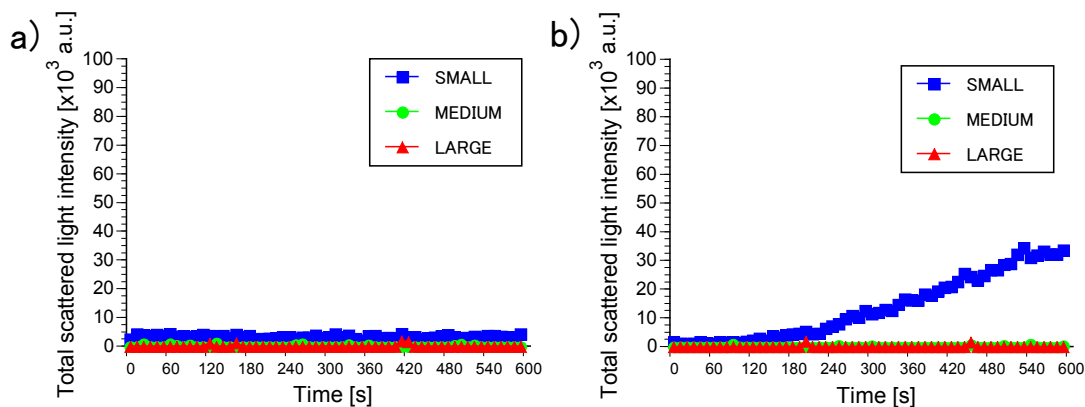


図 3.6 健常者 a) および糖尿病患者 b) における自然凝集曲線の典型例

また，健常者，HbA_{1c}が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者を対象に，血小板を自然凝集させる条件で，測定開始から 10 分間のS領域における総散乱光強度を表 3.1 に示した。その結果，健常者に比し，HbA_{1c}が 6.5%以上の糖尿病患者では 10 分間の総散乱光強度に有意な増加が認められたのに対し，6.5%未満の糖尿病患者では有意な増加は認められなかった。

表 3.1 健常者, HbA_{1c}が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者における小凝集塊の自然凝集

	健常者 (n=6)	糖尿病患者	
		HbA _{1c} < 6.5% (n=5)	6.5% ≤ HbA _{1c} (n=6)
血糖値 (mg/dl)	95±13	130±60	126±69
HbA _{1c} (%)	4.9±0.4	5.8±0.3*	7.3±0.5*
10 分間のtotal SLI (×10 ⁶ a.u.)	3.5±2.0	6.5±3.5	39.0±31.5*

Total SLI : 総散乱光強度, *: p < 0.05 vs. 健常者

3.5.2 ADP 惹起凝集

健常者および糖尿病患者における ADP 惹起血小板凝集能測定実験で得られた凝集曲線の典型的な一例を図 3.7 に示した. 凝集曲線は, 小, 中, 大凝集塊から検出された散乱光強度の総和が経時的に変化している状態を表している. ADP 惹起においては, 健常者では一度小凝集塊 (S 領域) が生成した後, 凝集塊が解離する一次凝集が認められたのに対し (図 3.7 a), 糖尿病患者では, 生成した小凝集塊が解離しない二次凝集が認められた (図 3.7 b). また, 糖尿病患者では小凝集塊とともに中凝集塊の生成が認められた.

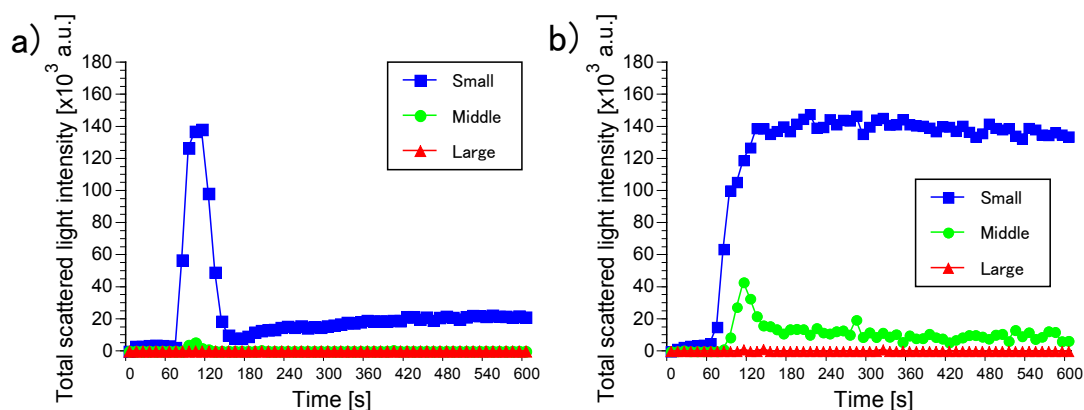


図 3.7 健常者 a) および糖尿病患者 b) における ADP 惹起凝集曲線の典型例

また、健常者、HbA_{1c}が6.5%未満および6.5%以上の糖尿病患者を対象に、測定開始から10分間のS領域における総散乱光強度、および測定開始1分後から3分後までの2分間のS領域における総散乱光強度を表3.2に示した。その結果、健常者に比し、HbA_{1c}が6.5%以上の糖尿病患者では10分間と2分間の両方で総散乱光強度に有意な増加が認められた。一方、6.5%未満の糖尿病患者では10分間の総散乱光強度に有意な増加は認められなかったが、2分間の総散乱光強度には有意な増加が認められた。

表 3.2 健常者、HbA_{1c}が6.5%未満および6.5%以上の糖尿病患者における小凝集塊のADP惹起血小板凝集

	健常者 (n=6)	糖尿病患者	
		HbA _{1c} < 6.5% (n=7)	6.5% ≤ HbA _{1c} (n=9)
血糖値 (mg/dl)	82±10	116±54*	135±76*
HbA _{1c} (%)	4.5±0.4	5.7±0.4*	7.3±0.5*
10分間のtotal SLI (×10 ⁶ a.u.)	22.0±13.2	31.2±18.9	64.0±25.8*
ADP添加後2分間のtotal SLI (×10 ⁵ a.u.)	10.6±10.4	64.4±48.5*	96.0±69.0*

Total SLI : 総散乱光強度, *: p < 0.05 vs. 健常者

3.5.3 エピネフリン惹起凝集

健常者および糖尿病患者におけるエピネフリン惹起血小板凝集能測定実験で得られた凝集曲線の典型的な一例を図3.8に示した。エピネフリン惹起においては、健常者では小凝集塊のみの生成が認められたが(図3.8 a)、糖尿病患者では小、中凝集塊の生成が認められた(図3.8 b)。

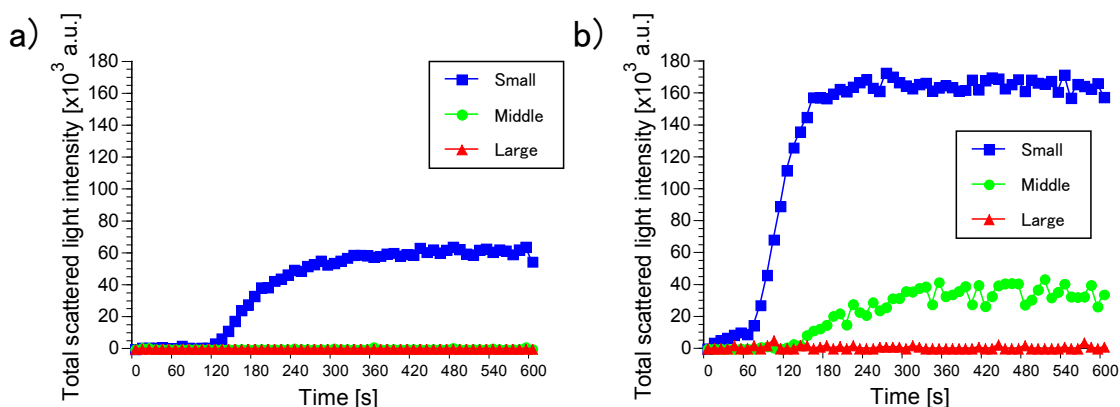


図 3.8 健常者 a) および糖尿病患者 b) におけるエピネフリン惹起凝集曲線の典型例

また、健常者、HbA_{1c}が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者を対象に、測定開始から 10 分間のS領域における総散乱光強度および測定開始 1 分後から 3 分後までの 2 分間のS領域における総散乱光強度を表 3.3 に示した。その結果、健常者に比し、HbA_{1c}が 6.5%以上の糖尿病患者では 10 分間と 2 分間の両方で総散乱光強度に有意な増加が認められた。一方、6.5%未満の糖尿病患者では 10 分間の総散乱光強度に有意な増加は認められなかったが、2 分間の総散乱光強度には有意な増加が認められた。

表 3.3 健常者、HbA_{1c}が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者における小凝集塊のエピネフリン惹起血小板凝集

	健常者 (n=6)	糖尿病患者	
		HbA _{1c} < 6.5% (n=5)	6.5% ≤ HbA _{1c} (n=7)
血糖値 (mg/dl)	86±11	103±23	138±64*
HbA _{1c} (%)	4.3±0.2	5.7±0.8*	7.1±0.4*
10 分間のtotal SLI (×10 ⁶ a.u.)	21.7±10.4	37.2±18.0	53.8±21.4*
エピネフリン添加後 2 分間のtotal SLI (×10 ⁵ a.u.)	2.3±2.6	60.1±73.7*	64.6±71.2*

Total SLI : 総散乱光強度, *: p < 0.05 vs. 健常者

3.5.4 コラーゲン惹起凝集

健常者および糖尿病患者におけるコラーゲン惹起血小板凝集能測定実験で得られた凝集曲線の典型的な一例を図 3.9 に示した。コラーゲン惹起においては、健常者、糖尿病患者ともに小、中、大凝集塊への生成が経時的に推移する様子が認められた (図 9 a, b)。また、中凝集塊の生成においては両者で同程度であるのに対して、小凝集塊と大凝集塊の生成においては糖尿病患者で明らかに増大していた。

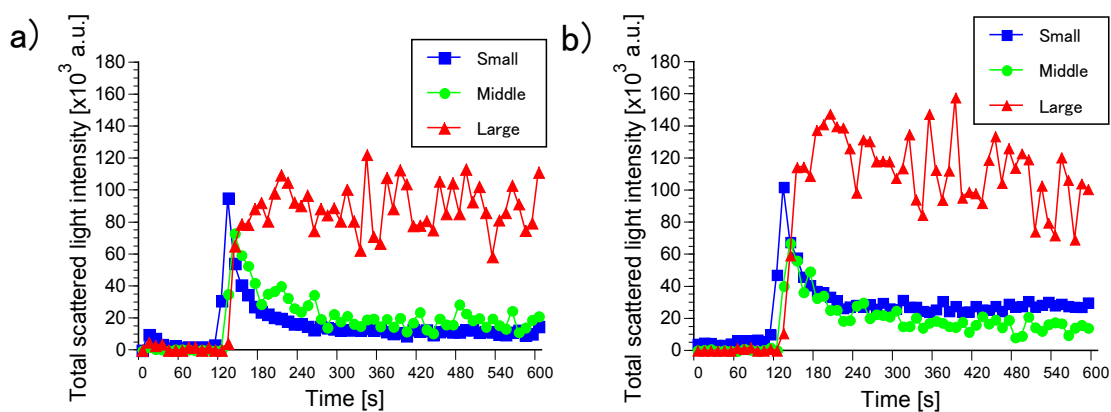


図 3.9 健常者 a) および糖尿病患者 b) におけるコラーゲン惹起凝集曲線の典型例

また、健常者、HbA_{1c}が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者を対象に、測定開始から 10 分間のS領域における総散乱光強度および測定開始 1 分後から 3 分後までの 2 分間のS領域における総散乱光強度をTable 3.4 に示した。その結果、健常者に比し、糖尿病患者の両群において 10 分間の総散乱光強度に有意な増加は認められなかったが、2 分間の総散乱光強度には有意な増加が認められた。

表 3.4 健常者, HbA_{1c}が 6.5%未満および 6.5%以上の糖尿病患者における小凝集塊のコラーゲン惹起血小板凝集

	健常者 (n=5)	糖尿病患者	
		HbA _{1c} < 6.5% (n=6)	6.5% ≤ HbA _{1c} (n=8)
血糖値 (mg/dl)	86±11	117±58	113±22*
HbA _{1c} (%)	4.2±0.2	5.4±0.6*	7.0±0.3*
10 分間のtotal SLI (×10 ⁶ a.u.)	17.8±7.3	30.3±19.8	22.5±17.7
コラーゲン添加後 2 分間のtotal SLI (×10 ⁵ a.u.)	9.4±14.4	55.1±19.3*	34.1±26.5*

Total SLI : 総散乱光強度, *: p < 0.05 vs. 健常者

以上の結果から, 同種同濃度の惹起物質で血小板を刺激した際, 健常者に比し, 糖尿病患者では血小板凝集能が亢進していることが示された. また, 測定開始 1 分後から 3 分後までの 2 分間の S 領域における総散乱光強度を血小板凝集能として評価することで, 糖尿病患者における血小板凝集能の亢進をより高精度に検出できることが示された.

3.6 考察 - レーザ散乱粒子計測法による血小板凝集能測定の有用性 -

緒言でも述べたように, 糖尿病患者における血栓性合併症の発症・進展の予防には早期の血小板凝集能亢進の検知, つまり血小板凝集能測定における小凝集塊の高精度な検出が必要不可欠である. 本章では, 健常者と合併症を伴わない糖尿病患者における小凝集塊の自然凝集を, 散乱光法を用いて検討した. 2 型糖尿病患者を対象に厳格な血糖コントロールにより患者の QOL を脅かす網膜症や腎症, 神経障害といった細小血管合併症の発症・進展が阻止できるかどうかを 6 年間追跡した Kumamoto Study において, HbA_{1c} が 6.5% 未満, 食後 2 時間血糖値が 180mg/dl 未満であれば細小血管合併症の出現する可能性が少ないことが報告されている[27]. よって, 糖尿病あるいはその予備軍の早期発見, 合併症発症の予防診断を目的に, 糖尿病患者を HbA_{1c} が 6.5% 未満と 6.5% 以上に分

け血小板凝集能を測定した。その結果、健常者に比し、HbA_{1c}が6.5%以上の糖尿病患者では小凝集塊の有意な増加が認められたが、HbA_{1c}が6.5%未満の糖尿病患者では有意な増加は認められなかった。このことは、HbA_{1c}が6.5%未満の糖尿病患者では、自然凝集をする患者としない患者が存在することが原因であると考えられる。先行研究において、糖尿病患者における自然凝集の増加は既にいくつか報告されている[10]-[12]。Fukudaらは、健常者に比し糖尿病患者において有意に自然凝集が増加していることを報告しているが、糖尿病患者の平均HbA_{1c}が7.5%であり[10]、一概に本結果とは比較し難い。またIwaseらは、糖尿病が進行することで併発する網膜症、腎症、神経障害の重篤度に伴って自然凝集の有意な増加を報告しているが、健常者とこれらの合併症を伴わない糖尿病患者とでは自然凝集に有意な差は認められていない[11]。よって、合併症の併発もなくHbA_{1c}も6.5%未満である糖尿病患者において検討した報告は未だなく、本実験結果からも自然凝集のみで糖尿病の初期および合併症併発前の血小板凝集能の亢進は検知できないため、惹起物質による血小板凝集能測定が必要だと思われる。

次に低濃度の血小板凝集惹起物質を用いて検討を行った。LSPAなどの凝集計による*in vitro*系の血小板凝集機序は、生体内の血栓止血機構とは異なる。血小板は、通常基石のような円盤状を示しているが、凝集惹起物質の添加により活性化され、棘状の偽足を出した球状に形態変化する。血小板の活性化に伴い、血小板膜糖タンパク質であるGPIIb/IIIa複合体が活性化し粘着タンパク質の高親和性受容体に構造を変化させる。血漿中には二量体構造を持つ粘着タンパク質のFibrinogenが存在するため、活性化血小板同士をFibrinogenがGPIIb/IIIaを介して架橋することで可逆的な血小板凝集が起こる（一次凝集）。そして凝集が惹起されると血小板の形態変化は促進され、凝集した血小板の偽足が複雑に絡み合い、ADPなどの濃染顆粒の放出や強い血小板凝集作用を持つTXA₂を産生する。放出されたADPやTXA₂は他の血小板を活性化し、不可逆的な凝集を亢進させる（二次凝集）[28]。ADP惹起による血小板凝集は、血小板膜上の受容体にADPが結合することにより、一次凝集を惹起することが報告されている[29]。本実験のADP惹起血小板凝集能測定においても、健常者では小凝集塊において、糖尿病患者では中凝集塊において一度凝集塊が生成した後に凝集塊が解離する一次凝集が認められた。エピネフリンは、血小板膜上に存在する α_2 -adrenaline受容体を介して血小板凝集を惹起することが知られている[30]。またエピネフリン自体は血小板凝集惹起物質ではなく、ADP結

合の親和性を増強させることで凝集を惹起しているという報告がある[31]。そのため、本実験のエピネフリン惹起血小板凝集能測定で観察された緩やかな凝集反応は、上述した一次凝集を経た後、二次凝集が起こっていると考えられる。コラーゲンによる血小板活性化は、血小板膜上のコラーゲン受容体であるGPVIとの結合により、刺激がチロシンリン酸化を介して伝達されると考えられている[32]。またコラーゲン惹起による血小板凝集は、ADPやエピネフリンとは異なり、一次凝集を経ずに最初から放出反応を伴う二次凝集を惹起するという報告がある[33]。本実験のコラーゲン惹起血小板凝集能測定においても、コラーゲン添加直後から大凝集塊を惹起する強い凝集反応が観察された。何れの惹起物質を用いた血小板凝集能測定においても、凝集曲線のパターンは同様であるが、健常者に比し、糖尿病患者ではより大きな凝集塊が生成されており、糖尿病患者において血小板凝集能の亢進が示された。糖尿病患者の血小板凝集能亢進は、上述した凝集機序からも、糖尿病患者の血小板におけるFibrinogenに対する結合の亢進[34]やTXA₂合成亢進[35]が関与していると考えられる。

さらに、健常者、HbA_{1c}が6.5%未満および6.5%以上の糖尿病患者を対象に、ADP、エピネフリン、コラーゲン惹起血小板凝集能測定から得られたデータを二通りの解析法で評価した。1) 小凝集塊生成後の血小板凝集能として、測定開始から10分間のS領域における総散乱光強度を求めた。2) 血小板の活性化から小凝集塊生成初期の血小板凝集能として、凝集惹起物質を添加した測定開始1分後から3分後までの2分間のS領域における総散乱光強度を求めた。第一の解析法では、小凝集塊の生成量を、第二の解析法では血小板の活性化を評価している。その結果、HbA_{1c}が6.5%以上の糖尿病患者においては、コラーゲン惹起を除いて、10分間の総散乱光強度および血小板凝集惹起物質を添加後2分間の総散乱光強度の両解析法で、健常者に比し、小凝集塊の有意な増加が認められた。一方、HbA_{1c}が6.5%未満の糖尿病患者においては、血小板凝集惹起物質を添加後2分間の総散乱光強度でのみ小凝集塊の有意な増加が認められた。この結果は、従来、解析されてきた小凝集塊生成後の血小板凝集能を評価するよりも、今回我々が提案した血小板の活性化から小凝集塊生成初期の血小板凝集能を評価する方が、より糖尿病患者における血小板活性化のし易さや血小板凝集の亢進度を顕著に反映するためと考えられる。先行研究においては、Matsunoらが合併症を伴わない糖尿病患者におけるADP惹起血小板凝集能測定を検討している[13]。Matsunoらは、まず糖尿病患者を自然

凝集する患者としない患者に分け、各群を健常者と比較している。その結果、自然凝集する糖尿病患者では健常者に比べ有意に小凝集塊が増加しているのに対し、自然凝集しない患者は有意な差は認められなかった。また、両糖尿病患者群のHbA_{1c}は自然凝集する群で平均7.2%、自然凝集しない群で6.7%であった。この結果は、本実験結果を支持するものであり、合併症を伴わず、HbA_{1c}が低い糖尿病患者では、健常者に比し、自然凝集および小凝集塊生成後の血小板凝集能、つまり10分間の総散乱光強度では判別しにくいことを示すものである。よって、我々が提案する新しい解析法を用いることにより、より高精度で糖尿病患者における血小板凝集能の亢進を検出可能であることが示された。今後、レーザ散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定は、我々が提案した解析法を用いることで、様々な疾患に臨床応用が可能であることが期待される。

3.7 結言

本章では、糖尿病患者において血小板凝集能が亢進していることを示した。また、血小板の活性化から小凝集塊生成初期に血小板凝集能の解析を限定することで、血小板活性化のし易さと血小板凝集の亢進度を明瞭に検知でき、健常者に比し、糖尿病患者における血小板凝集能の亢進をより高精度に検出することに成功した。次章以降では、糖尿病における血栓形成性亢進のもう一つの重要因子である血管内皮細胞に着目し検討を進めていく。その上で、生体内において血管内皮細胞が曝されている血流と血圧という血行力学的応力は、最大限考慮すべき実験条件である。しかし、生体内における血流と血圧の両者を生体外、つまり培養実験系で考慮した研究は少なく、確立された実験系は未だない。そこで次章では、生体内で血管内皮細胞が曝されている血行力学的応力を生体外で再現可能な灌流装置の開発に取り組んだ。

参考文献

- [1] Born, GV., Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal, *Nature*, Vol.194 (1962), pp.927-929.
- [2] Born, GV., Observations on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate, *The Journal of Physiology*, Vol.209, No.2 (1970), pp.487-511.

- [3] Born, GV., Hume, M., Effects of the numbers and sizes of platelet aggregates on the optical density of plasma, *Nature*, Vol.215, No.5105 (1967),pp.1027-1029.
- [4] Kitek, A., Breddin, K., Optical density variations and microscopic observations in the evaluation of platelet shape change and microaggregate formation, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Vol.44, No.3 (1980), pp.154-158.
- [5] Gear, AR., Lambrecht, JK., Reduction in single platelets during primary and secondary aggregation, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Vol.45, No.3 (1981), p.298.
- [6] Frojmovic, MM., Milton, JG., Duchastel, A., Microscopic measurements of platelet aggregation reveal a low ADP-dependent process distinct from turbidometrically measured aggregation, *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol.101, No.6 (1983), pp.964-976.
- [7] Thompson, NT., Scrutton, MC., Wallis, RB., Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus, *Thrombosis Research*, Vol.41, No.5 (1986), pp.615-626.
- [8] Ozaki, Y., Satoh, K., Yatomi, Y., Yamamoto, T., Shirasawa, Y., Kume S., Detection of platelet aggregates with a particle counting method using light scattering, *Analytical Biochemistry*, Vol.218, No.2 (1994), pp.284-294.
- [9] Yamamoto, T., Egawa, Y., Shirasawa, Y., Ozaki, Y., Sato, K., Yatomi, Y., Kume, H., A laser light scattering in situ system for counting aggregates in blood platelet aggregation, *Measurement Science and Technology*, Vol.6 (1995), pp.174-180.
- [10] Fukuda, K., Ozaki, Y., Satoh, K., Kume, S., Tawata, M., Onaya, T., Sakurada, K., Seto, M., Sasaki, Y., Phosphorylation of myosin light chain in resting platelets from NIDDM patients is enhanced: correlation with spontaneous aggregation, *Diabetes*, Vol.46, No.3 (1997), pp.488-493.
- [11] Iwase, E., Tawata, M., Aida, K., Ozaki, Y., Kume, S., Satoh, K., Qi, R., Onaya, T., A cross-sectional evaluation of spontaneous platelet aggregation in relation to complications in patients with type II diabetes mellitus, *Metabolism*, Vol.47, No.6 (1998), pp.699-705.
- [12] Yamamoto, T., Kamei, M., Yokoi, N., Yasuhara, T., Tei, M., Kinoshita, S., Platelet aggregates in various stages of diabetic retinopathy: evaluation using the particle-counting

- light-scattering method, *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, Vol.243, No.7 (2005), pp.665-670.
- [13] Matsuno, H., Tokuda, H., Ishisaki, A., Zhou, Y., Kitajima, Y., Kozawa, O., P2Y₁₂ receptors play a significant role in the development of platelet microaggregation in patients with diabetes." *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol.90, No.2 (2005), pp.920-927.
- [14] Riess, H., Braun, G., Brehm, G., Hiller, E., Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood, *American Journal of Clinical Pathology*, Vol.85, No.1 (1986), pp.50-56.
- [15] Thompson, NT., Scrutton, MC., Wallis, RB., Particle volume changes associated with light transmittance changes in the platelet aggregometer: dependence upon aggregating agent and effectiveness of stimulus, *Thrombosis research*, Vol.41, No.5 (1986), pp.615-626.
- [16] 寺倉守之, 一色高明, 島崎とも江, 横山直之, 丸山泰幸, 福田良昭, 遠藤悟郎, 河村裕, 佐藤友英, 全血を用いた新しい血小板凝集測定装置の有用性に関する検討 採血直後および1時間後の凝集能の変化とそれに及ぼす抗血小板薬の作用, *Japanese Circulation Journal*, Vol.64, No.Supplement 1 (2000), p.611
- [17] Kroll, MH., Hellums, JD., McIntire, LV., Schafer, AI., Moake, JL., Platelets and shear stress, *Blood*, Vol.88, No.5 (1996), pp.1525-1541.
- [18] Ikeda, Y., Murata, M., Goto, S., Von Willebrand factor-dependent shear-induced platelet aggregation: basic mechanisms and clinical implications, *Annals of the New York Academy of Sciences*, Vol.811 (1997), pp.325-336.
- [19] Moake, JL., Turner, NA., Stathopoulos, NA., Nolasco, LH., Hellums, JD., Involvement of large plasma von Willebrand factor (vWF) multimers and unusually large vWF forms derived from endothelial cells in shear stress-induced platelet aggregation, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.78, No.6 (1986), pp.1456-1461.
- [20] Ikeda, Y., Handa, M., Kawano, K., Kamata, T., Murata, M., Araki, Y., Anbo, H., Kawai, Y., Watanabe, K., Itagaki, I., et al., The role of von Willebrand factor and fibrinogen in platelet aggregation under varying shear stress, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.87, No.4 (1991), pp.1234-1240.

- [21] 池田康夫, 丸山征郎編, *血小板生物学*, (2004), 397-400 頁, メディカルビュー社.
- [22] 間瀬勘史, 血小板凝集能, *現代医療*, 第25巻 (1993), 3701-3703 頁.
- [23] Brunsting, A., Mullaney, PF., Differential light scattering from spherical mammalian cells, *Biophysical Journal*, Vol.14, No.6 (1974), pp. 439-453.
- [24] Loken, MR., Sweet, RG., Herzenberg, LA., Cell discrimination by multiangle light scattering, *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, Vol.24, No.1 (1976), pp. 284-291.
- [25] Eto, K., Takeshita, S., Ochiai, M., Ozaki, Y., Sato, T., Isshiki, T., Platelet aggregation in acute coronary syndromes: use of a new aggregometer with laser light scattering to assess platelet aggregability, Vol.40, No.1 (1998), pp.223-229.
- [26] 石村貞夫, 謝承泰, 久保田基夫, *よくわかる医学・歯学・薬学のための統計解析*, (2001), 52-61 頁, 東京図書.
- [27] Ohkubo, Y., Kishikawa, H., Araki, E., Miyata, T., Isami, S., Motoyoshi, S., Kojima, Y., Furuyoshi, N., Shichiri, M., Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: A randomized prospective 6-year study, *Diabetes Research and Clinical Practice*, Vol.28, No.2 (1995), pp.103-117.
- [28] Suzuki, H., Kinlough-Rathbone, RL., Packham, MA., Tanoue, K., Yamazaki, H., Mustard, JF., Immunocytochemical localization of fibrinogen on washed human platelets. Lack of requirement for fibrinogen during adenosine diphosphate-induced responses and enhanced fibrinogen binding in a medium with low calcium levels, *Blood*, Vol.71, No.4 (1988), pp.850-860.
- [29] Colman, RW., Aggregin: a platelet ADP receptor that mediates activation, *The FASEBJ Journal*, Vol.4, No.5 (1990), pp.1425-1435.
- [30] Motulsky, H., J., Insel, P., A., Adrenergic receptors in man: direct identification, physiologic regulation, and clinical alterations, *The New England Journal of Medicine*, Vol.307, No.1, (1982), pp.18-29.
- [31] Figures, WR., Scarce, LM., Wachtfogel, Y., Chen, J., Colman, RF., Colman, RW., Platelet ADP receptor and alpha 2-adrenoreceptor interaction. Evidence for an ADP requirement for epinephrine-induced platelet activation and an influence of epinephrine on ADP binding,

The Journal of Biological Chemistry, Vol.261, No.13 (1986), pp.5981-5986.

- [32] Miura, Y., Ohnuma, M., Jung, SM., Moroi, M., Cloning and Expression of the Platelet-Specific Collagen Receptor Glycoprotein VI *Thrombosis Research*, Vol.98, No.4 (2000), pp.301-309.
- [33] Nakano, T., Hanasaki, K., Arita, H., Possible involvement of cytoskeleton in collagen-stimulated activation of phospholipases in human platelets, *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.264, No.10 (1989), pp.5400-5406.
- [34] DiMinno, G., Silver, MJ., Cerbone, AM., Riccardi, G., Rivellese, A., Mancini, M., Platelet fibrinogen binding in diabetes mellitus. Differences between binding to platelets from nonretinopathic and retinopathic diabetic patients, *Diabetes*, Vol.35, Vol.2 (1986), pp.182-185.
- [35] Davi, G., Catalano, I., Averna M., Notarbartolo, A., Strano, A., Ciabattini, G., Patrono, C., Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus, *The New England Journal of Medicine*, Vol.322, No.25 (1990), pp.1769-1774.

第4章 圧力・流量同時制御型拍動性灌流装置の開発

4.1 緒言

血管内腔を覆っている血管内皮細胞は、循環系の恒常性維持に重要な役割を果たしている。近年、多くのバイオメカニクス分野の研究により血管内皮機能が化学的刺激のみならず機械的刺激によっても調節されていることが明らかにされてきている[1],[2]。生理的な状態においては、血管内皮細胞は常に血流に起因する剪断応力や血圧に起因する伸展張力と貫壁性圧力といった血行力学的応力に曝されている。これら応力の大きさは、解剖学的部位や動物種に応じて異なる[3],[4]。加えて、これら応力の大きさの変化は、高血圧症、動脈硬化症、血栓症などの血管障害と密接にかかわっている[5]-[7]。従って、血行力学的応力の生体内環境を培養細胞実験においても考慮することは極めて重要である。これまでに、剪断応力、伸展張力、貫壁性圧力を単独に培養血管内皮細胞に負荷する目的で、様々な種類の装置が開発されてきた。しかし、これら応力を複合的に培養細胞に負荷する装置はほとんどなく[8]-[10]、生体内の様々な血管レベルにおける応力、特に圧力については培養細胞実験において再現されてこなかった。

そこで本章では、体循環の流体力学モデルを構成し、圧力と流量を独立制御することで、生体内のあらゆる血管における貫壁性圧力と剪断応力を培養血管内皮細胞に負荷可能な拍動性灌流装置の開発を目的とした。

4.2 血管内における機械的応力

4.2.1 血流刺激

血流に起因する剪断応力は、血管壁の内面を覆っている内皮細胞を血流方向に歪ませる応力である[11]。半径 r の血管内を粘度 μ の血液が定常的に（層流状態で）流れているとき、血管壁に近い血液は粘性によって引き止められ、血流が中央に比べて遅くなる。

そのため、血流の速度分布は血管の中心軸からの半径方向の距離 r の二次式で表される放物線となる (図 4.1)。

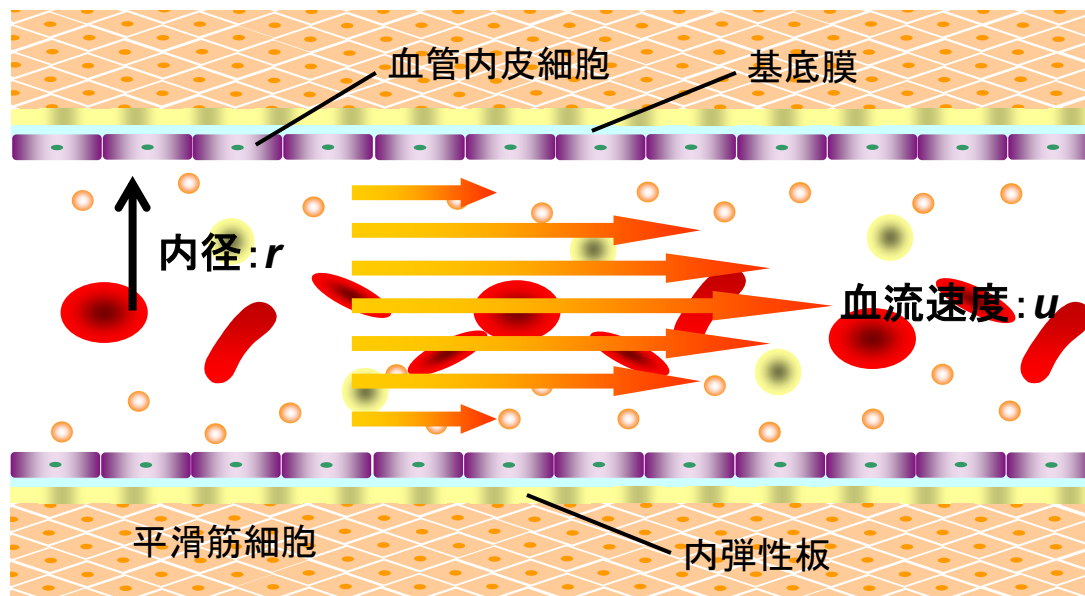


図 4.1 円筒血管内において血流が層流状態の場合の速度分布

この速度分布に現れる勾配、いわゆる速度勾配 D は、血液をニュートン流体と仮定し、血流速度を u で表すと、

$$D = -\frac{du}{dr} \quad (4.1)$$

となる。この速度勾配を持つ血液の流れは、血管壁を流れの方向に押しやる力、すなわち剪断力を血管に及ぼす。単位面積当たりの剪断力を剪断応力、あるいは接線応力、ずり応力と呼んでいる。血液がニュートンの粘性法則に従うとすると、

$$D = -\frac{1}{u}\tau \quad (4.2)$$

の関係が成り立つ (ここで、 τ は剪断応力) ので、 τ の大きさは流体の粘度と速度勾配 (剪断速度) の積

$$\tau = \mu \frac{du}{dr} \quad (4.3)$$

として表すことができる[12]。このことは、ある径の血管壁に加わる剪断応力の強さは、血管の粘度および流速に依存することを意味している。

剪断応力は解剖学的部位の違いで変化するが、同じ解剖学的部位においても異なる動物種や動物とヒトでは違いがある。また、同じ動物種やヒトにおいて動脈の種類別に平均剪断応力の大きさを計算すると、その大きさの違いは大動脈起始部からの距離に依存している。つまり、血管がより下流に位置するほど剪断応力の大きさはより小さくなる[13],[14]。しかし、細動脈、毛細血管、細静脈を含む微小循環における血行動態や血液レオロジーは、上述した動脈系を含む広域循環における血行動態や血液レオロジーとは違う。なぜならば、微小循環では血流は小さくなるが、血管の内径も小さくなるので、血管壁の剪断速度が大動脈より大きくなる。従って、微小循環における剪断応力は広域循環における剪断応力よりも比較的大きい[15]。一方で、同じ種類の動脈において異なる動物種やヒトで平均剪断応力の大きさを計算すると、その違いは明らかである[4]。実験動物のデータとヒトのデータを比較すると、より小さな動物種において平均剪断応力がより大きくなっている。表 4.1 に Kamiya らが計算した、血管部位別の剪断応力の値を示した[16]。ヒトの生理的条件化の大動脈では $10\text{-}20 \text{ dyn/cm}^2$ 、一方、静脈では $1\text{-}6 \text{ dyn/cm}^2$ の剪断応力が血管壁に作用する。ここで示した値は平均血流量から算出した平均値である。

血管内皮に作用する剪断応力を概算することはできるが、厳密に決定することは極めて難しい[17],[18]。なぜならば、血管は直線的な導管ではなく、三次元的に複雑な形態を取り、かつ弾性があるからである。血管は、湾曲や分岐もしているため、血液の流れが非常に複雑化し、血管壁にかかる剪断応力の分布も込み入っている。また、血流が湾曲部や分岐部に差し掛かると、血液が壁について流れることができなくなり、一時壁から離れて再び壁に付くようになる。これを流れの剥離 (flow separation) と呼んでいる。流れの剥離の起こる場所では血流はよどんでゆっくり渦巻く流れが生じる。こうしたところでは血管壁にかかる剪断応力は小さく、その方向や強さが非定常となってしまう[19]。さらに、実際の血流は三次元の形状に沿った層流ではなく、時間的にも空間的にも不規則な二次流や乱流が生じ、壁ずり応力の分布も大変複雑になる。

表 4.1 血管部位別における剪断応力[16]より引用

血管部位	血管径 (cm)	血流速度 (cm/s)	剪断速度 (s^{-1})	粘度 (Pa·s)	剪断応力 (Pa)
大動脈	1.0	50	400	0.003	1.2
中動脈	0.3	13	347	0.003	1.04
〃	0.3	19	525	0.003	1.58
〃	0.34	23	546	0.003	1.64
小動脈	0.1	8	640	0.0029	1.86
終末動脈	0.06	6	800	0.0028	2.3
細動脈	0.002	0.3	1 200	0.0012	1.41
毛細血管	0.000 55				2.08
〃	0.000 53				2.61
〃	0.000 7				~10
細静脈	0.003	0.07	187	0.0015	0.28
終末静脈	0.15	1.3	69	0.003	0.2
小静脈	0.24	1.5	50	0.003	0.15
中静脈	0.6	3.6	48	0.003	0.14
大静脈	1.25	33.0	211	0.003	0.63

従来、剪断応力の計算は血管壁が平坦であることを前提としてきたが、実際には血管壁内面を覆う内皮細胞には高さ（数 μm ）があり、微視的に見ると凹凸がある。山口はこの問題を数値流体力学的に検討し、1個の内皮細胞にかかる剪断応力は部位により異なり、一様とならないことを証明した[20]。例えば、流れの方向が内皮細胞の長軸に対して直交するときは、最も背の高い細胞核部分の下流には渦が生じ、表面の剪断応力は最低値と最高値とで数倍の開きがあるという。

また、病的状態にある血管では剪断応力の大きさは変わる。例えば、血管に粥状動脈硬化（アテローム）による狭窄性病変が存在すると、狭窄部には非常に大きい剪断応力が発生する[21],[22]。Backらは、直径3mmの冠状動脈に50%の狭窄があり、血流量が100 ml/minのときの剪断応力をNavier-Stokesの運動方程式から計算した。その結果、1心拍内で瞬間最大400 dyn/cm^2 の剪断応力がかかることが分かった[21]。

また、細動脈レベルでは、収縮や弛緩に伴い血管の形状が大きく変化するので、壁の粘性が異常に高まると内皮にかかる剪断応力も増加する。他方、出血などで血流速度が低下し、白血球が血管壁に付着するような状態では、血液の見かけの粘性が上昇し、血管壁にかかる剪断応力が 390 dyn/cm^2 (径が $50 \text{ }\mu\text{m}$ の細動脈) に達することが報告されている[23].

4.2.2 血圧刺激

血圧は心拍動に伴って周期的に変動するため、血管内皮も血管の円周方向に周期的に伸展され、内皮細胞には伸展張力が発生する。また、内皮細胞は血圧と血管外の組織圧との圧較差による貫壁性圧力を受けて細胞が圧平される。血圧プロファイルは、解剖学的部位のみでなく、動物や組織の違いにも依存している[3]。生体内において血管の内圧は、血管径が約 $300\text{-}400 \text{ }\mu\text{m}$ で徐々に減少し始め、約 $300\text{-}400 \text{ }\mu\text{m}$ の径を有する小動脈から約 $10 \text{ }\mu\text{m}$ の径を有する細動脈までの血管が抵抗動脈として機能する[24]。また、心拍動に伴い血管径が伸展する割合は、ヒトの大動脈で $9\sim 12\%$ 、頸動脈で $1\sim 2\%$ 、大腿動脈で $2\sim 15\%$ 、肺動脈で $6\sim 10\%$ 、イヌの大動脈では $1\sim 8\%$ 、ネコの大動脈では 15% 程度と報告されている[25]。しかし、貫壁性圧力で内皮細胞の変形がどの程度起きるかについては良く分かってない。

4.3 機械的応力負荷装置

4.3.1 剪断応力負荷装置

血管内皮細胞に対する剪断応力の影響を検討する研究は、培養した細胞に定量的な流れを負荷する実験装置が導入されてから急速に進展した。これまで種々のタイプの負荷装置が考案され、実験に使用されてきた。その主な装置は、回転円盤型[26],[27]、平行平板型[28]-[30]、チューブ型[8],[31]である。

以下に回転円盤型負荷装置について述べる[26],[27]。ディッシュの底に培養細胞を直接付着させるか、あるいは細胞を付着させたカバースリップを設置し、ディッシュの中

の培養液中に円盤を浸す。この円盤をモーターで回転させると培養液が同心円状に流れ、細胞に剪断応力がかかる。表面が平らな円盤を使うと、細胞にかかる剪断応力の大きさはディッシュの中心からの距離に依存する（ディッシュの外側ほど剪断応力は大きくなる）が、円錐版ではディッシュのすべての場所で一様な剪断応力がかかる。剪断応力の大きさは、

$$\tau = \frac{\mu\omega}{\theta} \quad (4.4)$$

ここで、 τ は剪断応力、 μ は粘度、 ω は角速度、 θ は円錐角である。表面が平らな円盤では、回転速度および円盤とディッシュの底との距離を変えることで、円錐版では円錐の角度と回転速度を変えることで、細胞にかかる剪断応力の大きさを調節することができる。また、本装置は非層流性の流れを負荷することにも使われる。円錐の角度を大きくし、回転速度を高くすると円周方向の流れが円錐板の近くでは中心から外側へ、ディッシュの底面では外側から中心へ向かうようになる。このため、ディッシュ底面に付着している細胞層には場所によって作用する剪断応力の大きさが不均一になり、また、流速のベクトルも時間的、空間的に非定常になる。

次に、平行平板型負荷装置について述べる[28]-[30]。プラスチックあるいはガラスでできた平板に対向してある厚さのガスケットを挟み、細胞の付着したカバースリップあるいはガラス板を置く。液の出口と入り口を付け、シリコンチューブと連結し、リザーバからローラーポンプで液を灌流する。このとき流路の断面は長方形となり、細胞にかかる剪断応力は後述する式(4.7)で算出することができる。

最後に、チューブ型負荷装置について述べる[8],[31]。細胞付着性の良いシリコンチューブの内面に細胞を培養し、チューブの中に培養液を灌流することで細胞に流れ刺激を加える。シリコンチューブは弾性があるので流れを起こすと内圧が増加しチューブが伸展し、細胞には剪断応力とともに伸展張力が働く。ポンプの出力を調節して拍動性に液を送ると、実際の生体の血管で見られる血流プロファイルを模擬した負荷を行うことができる。

4.3.2 伸展張力負荷装置

伸展張力の作用は内皮細胞を弾性膜上に培養し、それを引き伸ばして細胞の反応を検討することができる。Sumpio らは、コンピュータ制御のできる伸展張力負荷装置を開発した[32]。底が親水性の弾性膜でできた円形ディッシュに細胞を培養し、ディッシュを装置に設置する。ディッシュの底に定量的な陰圧をかけると、弾性膜は一定の距離を伸びて細胞に伸展張力がかかる。陰圧を除くと膜は元の状態に戻るため、これを繰り返すと *in vivo* の血管に作用する周期的な張力刺激を細胞に与えることができる。しかし、この装置の難点はディッシュの底の細胞に均一な張力がかからないことである。円形の弾性膜の辺縁は良く伸びるので細胞にかかる伸展張力は大きいですが、中心部はそれほど伸びず伸展張力は小さい。この問題を解決する方法として、Naruse らは、極薄シリコン膜チャンバを用い、細胞全体に均一な伸展刺激を加えることのできるシステムを開発した[33]。

4.3.3 貫壁性圧力負荷装置

血管内皮細胞に対する貫壁性圧力の影響を検討する研究は報告が少ない。Hishikawa ら[34],[35]は、密閉容器内に培養血管内皮細胞を設置し、圧縮ヘリウムガスを注入することで内圧を上昇させた。また、Sato ら[36],[37]は、平行平板型負荷装置を改良し、リザーバの高さを調節し水柱圧差を利用することで静水圧負荷を実現した。Hishikawa らの方法では細胞培養液や酸素の交換が行えないため、長時間の圧力負荷は難しいが、Sato らの方法では酸素をバブリングした細胞培養液を微量に灌流しているため、長時間の圧力負荷が可能である。

4.4 圧力・流量同時制御型拍動性灌流装置の開発

4.4.1 3要素 Windkessel モデル

3要素Windkesselモデルは最も広く応用されている体循環の集中定数モデルである[38]。3要素Windkesselモデルは、大動脈特性インピーダンス (R_c)、大動脈コンプライアンス (C)、末梢血管抵抗 (R_p) から構成されている。3要素Windkesselモデルにより、

生体に近い圧力波形や流量波形を作り出すことができる[38]-[40]。大動脈特性インピーダンスは拍動性の流入に対する大動脈の抵抗を表し、圧力を流量で割ることで表される。大動脈コンプライアンスは体積増加に対する大動脈の弾性特性を表し、体積変化を圧力変化で割ることで表される。末梢血管抵抗は血流に対する末梢血管床の抵抗を表し、平均圧力を平均流量で割ることで表される。

4.4.2 構成要素

3要素 Windkessel モデルの流体力学モデルは過去の研究において考案されている[38]。我々は、その流体力学モデルを拍動性灌流装置に応用した。装置の模式図を図4.2に示す。

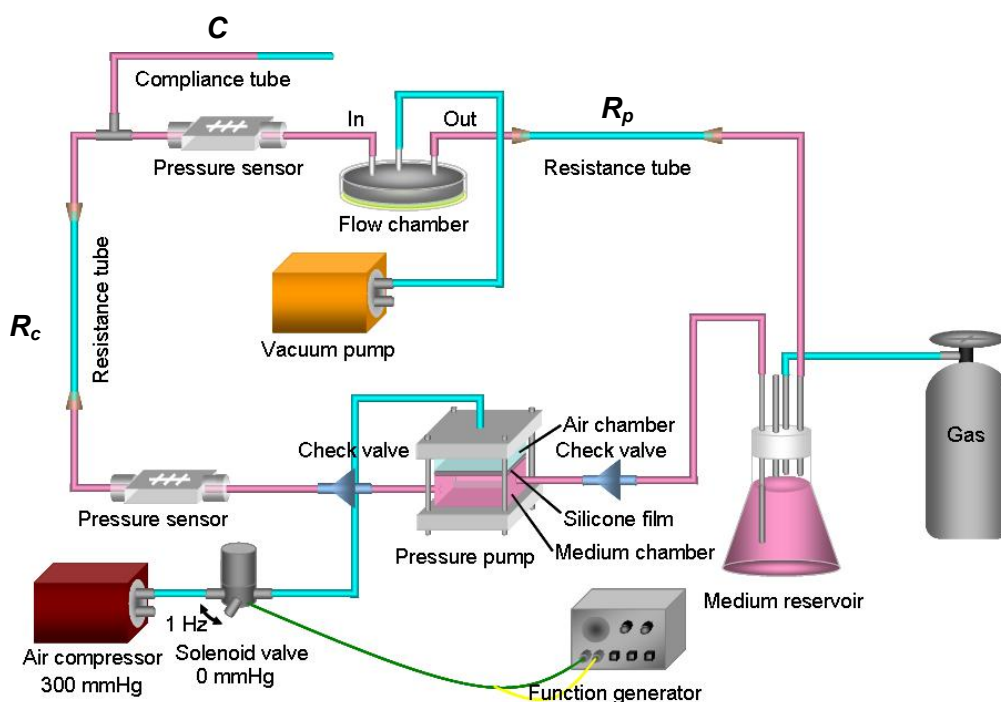


図 4.2 培養血管内皮細胞用拍動性灌流装置の概略図

前述した3要素Windkesselモデルにおいて、大動脈特性インピーダンス (R_c) と末梢血管抵抗 (R_p) はレジスタンスチューブで、大動脈コンプライアンス (C) はコンプライアンスチューブで実装した。本装置で唯一の駆動源である圧力ポンプは、圧力を伴った

一方向の拍動流を生成する。圧力ポンプ前後で逆流が生じないように注入口と排出口には逆弁が接続されている。圧力ポンプはシリコンフィルムでエアチャンバとメディウムチャンバに仕切られている。またエアチャンバは電磁弁（MTV-3-NM6H-1, Takasago Electric, Nagoya, Japan）に接続されており、電磁弁はエア・コンプレッサ（T08P5S03, Amadera Pneumatics, Tokyo, Japan）に接続されている。大気圧とエア・コンプレッサからの圧力はファンクションジェネレータ（VP-7422A, National, Osaka, Japan）を使って1 Hz毎に電磁弁で切り替えられている。圧力ポンプから出力される圧力波形を図4.3に示す。

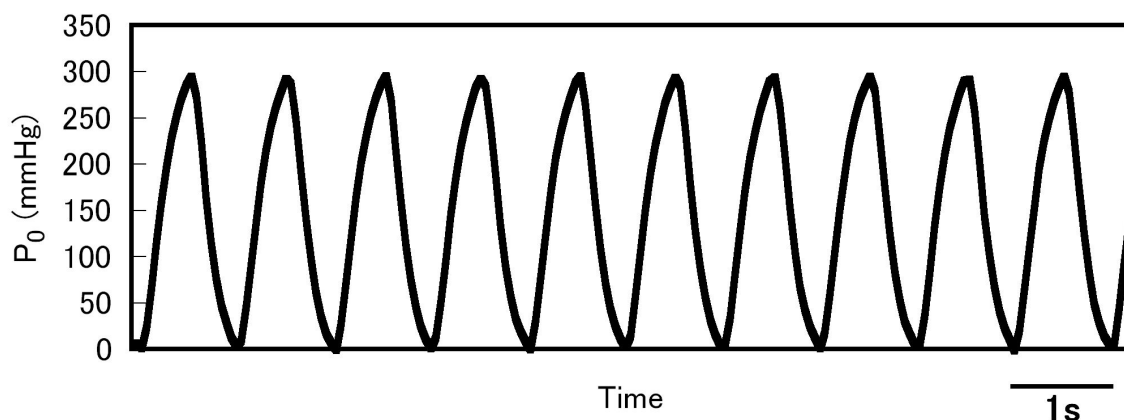


図 4.3 圧力ポンプから出力される圧力波形

2つのレジスタンスチューブは圧力と流量を制御する。レジスタンスチューブは、両端に注射針（23G×1” または 26G×1/2” , JMS, Tokyo, Japan）を取り付けた極めて細かいポリエチレンチューブ（Intramedic PE 20 または PE 50, Clay Adams, Becton Dickinson, NJ, USA）から成る。層流の場合、レジスタンスチューブの両端の圧力損失 (DP) は、ハーゲン - ポアズイユの式に従って、流量 (Q) とチューブ長 (l) に比例し、チューブ径 (r) に反比例する。

$$DP = \frac{8\mu Ql}{\pi r^4} \quad (4.5)$$

ここで μ は粘度である。本装置において、2つのレジスタンスチューブ以外の圧力損失は考慮しなかった。コンプライアンスチューブは、サフィード延長チューブ（SF-ET3825,

TERUMO, Tokyo, Japan) の一端に空気を封入することで脈幅を制御する。一定温度において、コンプライアンスチューブの空気容量は、ボイルの法則に従って圧力に反比例する。本装置の初期状態は、圧力は大気圧とし (P_a)、コンプライアンスチューブに封入されている空気容量は V_a とする (図 4.4 a)。灌流液 (V_m) がコンプライアンスチューブに流れ込むと、コンプライアンスチューブ内に空気圧縮が生じ、式 (4.6) に従って圧力 (P) が働く (図 4.4 b)。また、コンプライアンスチューブのコンプライアンス C は式 (4.7) で表される。

$$(P_a + P)(V_a - V_m) = P_a V_a \quad (4.6)$$

$$C = \frac{V_m}{P} \quad (4.7)$$

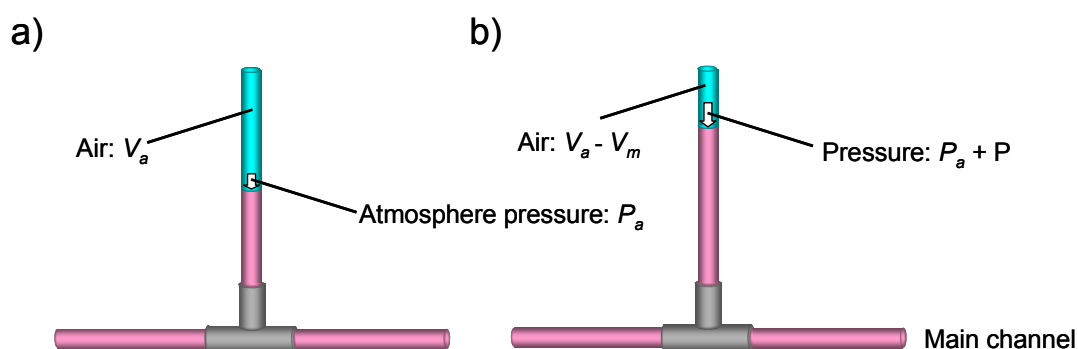


図 4.4 コンプライアンスチューブ概略図

フローチャンバはアッパーデッキ、シリコンガasket、培養ディッシュから構成されており、培養血管内皮細胞に負荷される剪断応力を制御する (図 4.5)。アッパーデッキは透明なポリカーボネートで作られており、インレットとアウトレットに接続されている。シリコンガasketはアッパーデッキと培養ディッシュの間に真空ポンプで減圧することで挟まれており、直方体の形をした流路を作り出す。血管内皮細胞はポリスチレン製のディッシュ上に培養されている。剪断応力は次の式 (4.7) で計算される。

$$\tau_w = \frac{6\mu Q}{wh^2} \quad (4.7)$$

ここで、 τ_w は剪断応力 (Pa)、 μ は粘度 (8.5×10^{-4} Pa · s at 37°C)、 Q は流量 (cm^3/s)、 w は

流路の幅 (5 mm), h は流路の高さ (0.254 mm) である. 2 つの圧力トランスデューサ (PM/4, Living Systems Instrumentation, Burlington, USA) は圧力ポンプの直後とフローチャンバの直前に置いた. 2 つの圧力トランスデューサはフローチャンバと同じ高さにし, 圧力は初期値を 0 に設定した. 細胞培養液である灌流液は, 実験中, 高温槽でメディウムリザーバを 37 °C に保っており, メディウムリザーバに混合ガス (CO₂ 5 %, O₂ 20 %, N₂ balance) をバブリングすることで灌流液の pH を 7.4 に保った. 圧力ポンプ, レジスタンスチューブ, コンプライアンスチューブ, フローチャンバもまた実験中 37 °C に保った. すべての構成要素はサフィード延長チューブ (SF-ET3825, TERUMO, Tokyo, Japan) で繋がっている.

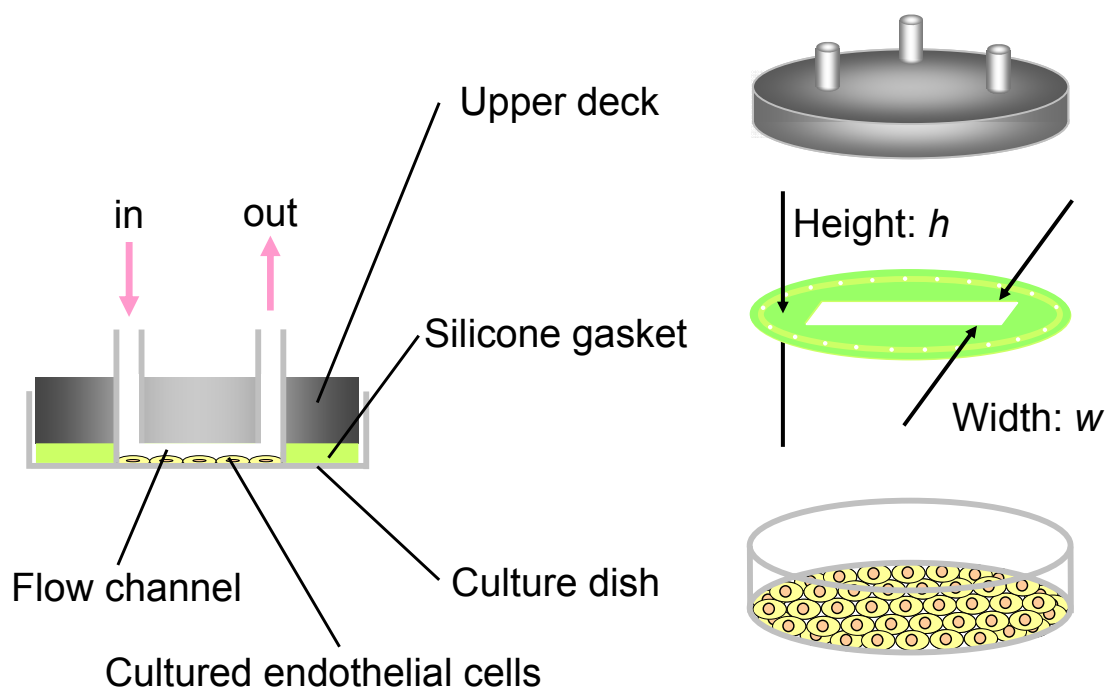


図 4.5 フローチャンバ概略図

4.4.3 シミュレーション

フローチャンバ内の圧力と流量は図 4.6 に示した装置の等価電気回路をシミュレーションすることで決定する. 等価電気回路における電圧, 電流, 電荷は, 装置における圧

力，流量，体積に相当する．しかし，実際にはコンプライアンスチューブに流れ込む体積は圧力に正比例しないので，圧力は式 (4.6) を使って計算する．シミュレーションの入力圧力 (P_0) は図 4.3 に示した圧力ポンプからの実際の測定値を使う．初期状態において入力圧力 (P_0) が 0 のときは，フローチャンバ内の圧力 (P) と流量 (I_c, I_p, I) は 0 である． P_0 と P はゲージ圧である．フローチャンバ内の圧力 (P) と流量 (I_p) は，次の手順によってシミュレートされる．レジスタンスチューブ (R_c) における流量 (I_c) は次の式 (4.8) で計算される．

$$I_c = \frac{(P_0 - P)}{R_c} \quad (4.8)$$

レジスタンスチューブ (R_p) における流量 (I_p) は次の式 (4.9) で計算される．

$$I_p = \frac{P}{R_p} \quad (4.9)$$

コンプライアンスチューブに流れ込む流量 (I) は次の式 (4.10) で計算される．

$$I = I_c - I_p \quad (4.10)$$

コンプライアンスチューブに流れ込む流量 (I) の総和は，コンプライアンスチューブ内の空気圧縮 (V_m) に等しい．

$$V_m = \sum I \quad (4.11)$$

フローチャンバ内の圧力 (P) は，式 (4.12) で計算される．

$$P = \frac{P_a V_m}{V_a - V_m} \quad (4.12)$$

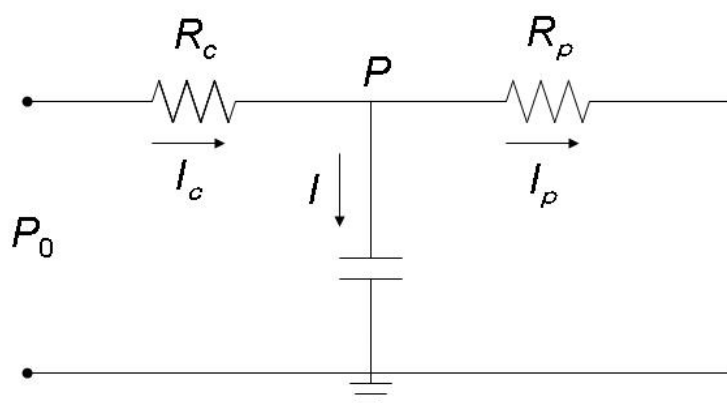


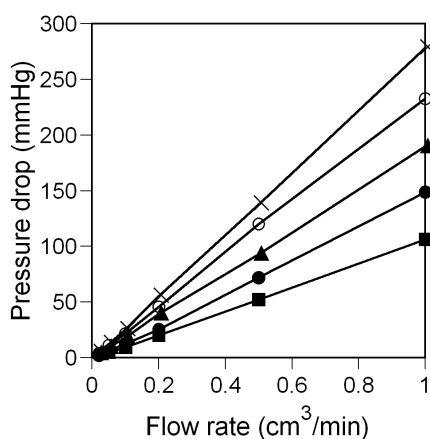
図 4.6 装置の等価電気回路図

4.5 システム評価

4.5.1 抵抗値測定

レジスタンスチューブの抵抗値を計算するために、ポリエチレンチューブ PE20 または PE50 で作成したレジスタンスチューブにおける圧力損失と流量の関係を検討した。シリンジポンプ (Genie, Kent Scientific, Connecticut, USA) を用いて、細胞培養液を一定流量で長さ 20, 40, 60, 80, 100 cm のレジスタンスチューブに流し、圧力損失を計測した。実験中、細胞培養液は 37°C に保った。PE20 と PE50 の内径は、それぞれ 0.38 mm と 0.58 mm であった。その結果、PE20 または PE50 で作成したレジスタンスチューブともに、すべてのレジスタンスチューブの長さにおいて、圧力損失は流量に比例した (図 4.7)。また、PE20 または PE50 で作成したレジスタンスチューブの抵抗値は、レジスタンスチューブの長さに比例し一意的に決定されることが示された (図 4.8)。

a) PE20



b) PE50

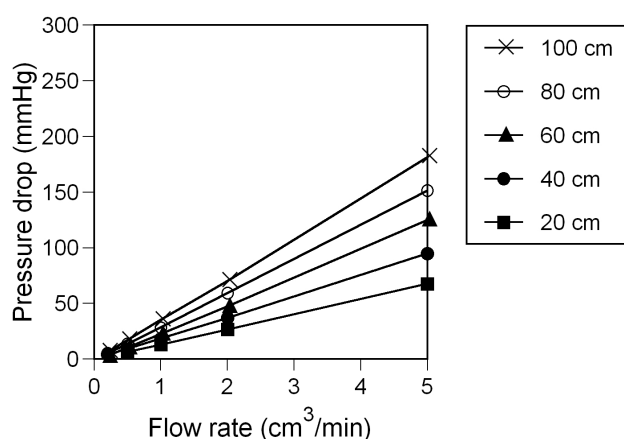


図 4.7 レジスタンスチューブにおける圧力損失と流量の関係

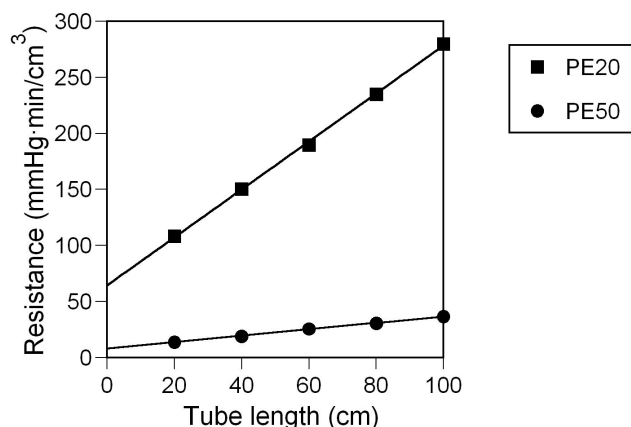


図 4.8 レジスタンスチューブにおける抵抗値とチューブ長の関係

4.5.2 シミュレーション値と測定値との精度比較

圧力と流量を独立に制御可能かどうかを検討するため、フローチャンバ直前の圧力と流量の測定値をシミュレーション値と比較した。平均圧力、平均流量、脈幅の高値および低値を表 4.2 に示したように定め、それら値のすべての組み合わせを出力するために、 R_c , R_p , C をシミュレーションによって計算した (表 4.3)。そして、シミュレーションによって得られた各パラメータ (R_c , R_p , C) の値を装置に設定し、すべての組み合わせに対して圧力を測定した。また、流量は測定された圧力を R_p で割って求めた。

表 4.2 設定した平均圧力、平均流量、脈幅の高値または低値

	平均圧力 (mmHg)	平均流量 (cm ³ /min)	脈幅 (mmHg)
高値	100	4	20
低値	50	0.5	5

表 4.3 平均圧力，平均流量，脈幅の高値または低値の全組み合わせにおいてシステムシミュレーションによって得られた R_c ， R_p ， C

平均圧力	平均流量	脈幅	R_c (mmHg·min/cm ³)	R_p (mmHg·min/cm ³)	C (m ³ /mmHg)
高値	高値	高値	12.5	25	1293
高値	高値	低値	12.5	25	2016
高値	低値	高値	100	200	155
高値	低値	低値	100	200	641
低値	高値	高値	25	12.5	605
低値	高値	低値	25	12.5	2556
低値	低値	高値	200	100	76
低値	低値	低値	200	100	325

表 4.3 に示した R_c ， R_p ， C のすべての組み合わせにおける平均圧力，平均流量，脈幅の測定データを表 4.4 に示す．結果的に，すべての組み合わせにおいて表 4.2 で定義した平均圧，平均流量，脈幅の高値と低値が正確に再現された．従って，本装置は，平均圧，平均流量，脈幅を独立に制御可能であることが示された．

表 4.4 装置に適用した R_c ， R_p ， C の全ての組み合わせにおける平均圧力，平均流量，脈幅の計測データ

R_c (mmHg·min/cm ³)	R_p (mmHg·min/cm ³)	C (m ³ /mmHg)	平均圧力 (mmHg)	平均流量 (cm ³ /min)	脈幅 (mmHg)
12.5	25	1293	100	4	20
12.5	25	2016	100	4	5
100	200	155	100	0.5	21
100	200	641	100	0.5	6
25	12.5	605	50	4	20
25	12.5	2556	50	4	5
200	100	76	50	0.5	20
200	100	325	50	0.5	5

4.5.3 生体内測定値の再現

生体内の血管における圧力と剪断応力を本装置で再現可能かどうかを検討した。ヒトの血圧と実験動物の剪断応力の測定値[41],[16]を，解剖学的部位を基に組み合わせ（表4.5），それらの値を本装置で再現した。

表 4.5 生体内の解剖学的部位における平均圧力プロファイルと平均剪断応力レベル

解剖学的部位	平均圧力 (mmHg)	平均剪断応力 (Pa)
大動脈	100	1.20
小動脈	80	1.86
細動脈	60	1.41
毛細血管	30	0.70
細静脈	20	0.28
大静脈	10	0.15

その結果，大動脈レベルにおける平均圧力と平均剪断応力は，装置パラメータ $R_c = 11$ mmHg·min/cm³， $R_p = 21$ mmHg·min/cm³， $C = 1816$ m³/mmHgによって再現された（図4.9 a）。小動脈レベルにおける平均圧力と平均剪断応力は，装置パラメータ $R_c = 10$ mmHg·min/cm³， $R_p = 11$ mmHg·min/cm³， $C = 2172$ m³/mmHgによって再現された（図4.9 b）。細動脈レベルにおける平均圧力と平均剪断応力は，装置パラメータ $R_c = 16$ mmHg·min/cm³， $R_p = 11$ mmHg·min/cm³， $C = 3394$ m³/mmHgによって再現された（図4.9 c）。毛細血管レベルにおける平均圧力と平均剪断応力は，装置パラメータ $R_c = 43$ mmHg·min/cm³， $R_p = 11$ mmHg·min/cm³， $C = 2437$ m³/mmHgによって再現された（図4.9 d）。細静脈レベルにおける平均圧力と平均剪断応力は，装置パラメータ $R_c = 110$ mmHg·min/cm³， $R_p = 18$ mmHg·min/cm³， $C = 2495$ m³/mmHgによって再現された（図4.9 e）。大静脈レベルにおける平均圧力と平均剪断応力は，装置パラメータ $R_c = 230$ mmHg·min/cm³， $R_p = 16$ mmHg·min/cm³， $C = 2567$ m³/mmHg（図4.9 f）。

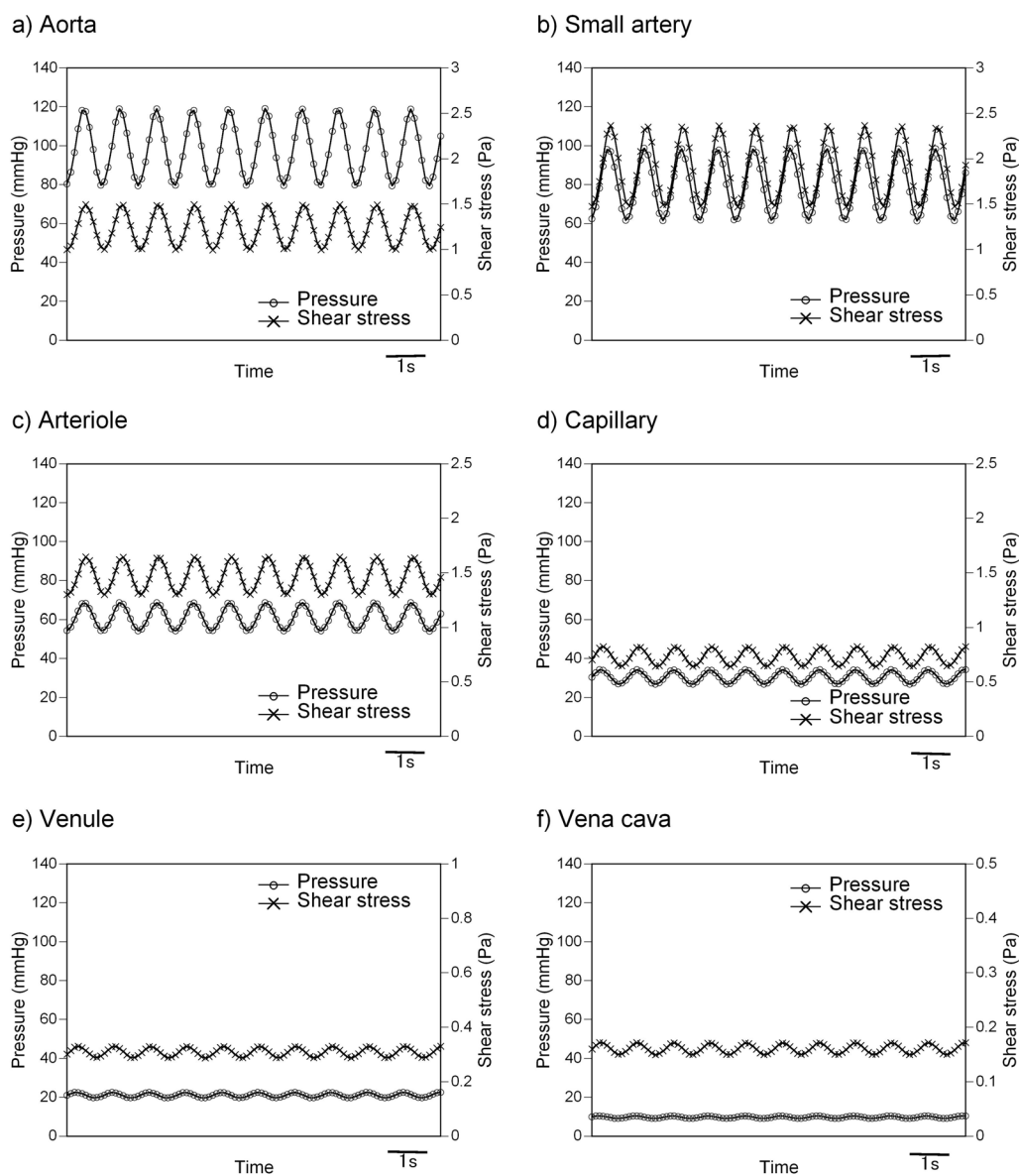


図 4.9 装置を用いた生体内測定データの再現

4.6 システムの有用性と改善点

培養血管内皮細胞の研究は、静置条件下での実験がほとんどであるが、上述したように、一部の研究者は血管内皮細胞に対する機械的応力の影響を様々な装置を用いて実験してきた。また近年、何人かの研究者は生理的な圧力と剪断応力を伴った拍動流が培養

血管内皮細胞に与える影響を検討している。Benbrahim らは、偏心カムで駆動するペローズポンプを用いて、拍動流と拍動圧を生成することが可能な弾性チューブ型灌流装置を開発し、犬やヒトの動脈の血管弾性を再現した[8]。Shumin らは、定常流を生成するギアポンプと脈圧を生成するダイヤフラムポンプを用いた弾性チューブ型灌流装置を開発し、生理的な剪断応力と伸展張力の組み合わせを再現した[9]。Peng らは、2つのリアルタイムサーボ機構を制御することで、現実的な圧力波形と流量波形を生成可能な灌流装置を開発し、動脈の圧力波形と生理的な剪断応力の同時生成を再現した[10]。しかし現在までに、本章で開発した灌流装置のように、生体の血管の異なったレベルにおける圧力と剪断応力の両方を模擬可能な灌流装置は開発されていない。一方、本章で開発した灌流装置には、改良の余地もまだある。第一に、本装置は、1Hzの一方向正弦波形を取り入れているが、生体の流量波形は複雑であり[42]、大動脈ではある程度の逆流も起こっている[43]。さらに大動脈における剪断応力の脈幅は本装置で再現した脈幅よりも大きい[44]。第二に、本装置では、平行平板型のフローチャンバを用いたので、培養血管内皮細胞に対する伸展張力の影響は考慮されていなかった。しかし、弾性チューブ型のフローチャンバ[8]-[10]に血管内皮細胞を培養して本装置に組み込むことで、剪断応力、伸展張力、貫壁性圧力といったすべての機械的応力の影響を検討することが可能である。しかし、生体内において、どの程度拍動流の波形や伸展張力が血管内皮細胞に影響を与えているかはまだ解明されていない。ある報告によると、伸展張力の影響は、貫壁性圧力や剪断応力の影響よりも小さいことが示唆されている[45]。従って、もし波形や伸展張力の影響が比較的小さいのであれば、本装置のようにより簡単なモデルを使って生体内の状態を模擬することで十分であろう。

4.7 結言

本章では、体循環の等価電気回路における流体力学モデルを応用することで、所望の圧力と剪断応力を独立に制御し、同時に培養血管内皮細胞に負荷することが可能な拍動性灌流装置を開発した。また本装置を用いて、生体内の異なる血管部位における圧力レベルと剪断応力レベルを高精度に再現することができた。次章では、本装置の有用性を応力負荷における血管内皮細胞形態の変化から検討した。

参考文献

- [1] Recchia, FA., Senzaki, H., Saeki, A., Byrne, BJ., and Kass, DA., Pulse pressure-related changes in coronary flow in vivo are modulated by nitric oxide and adenosine, *Circulation Research*, Vol.79, No.4 (1996), pp.849-856.
- [2] Saeki, A., Recchia, F., and Kass, DA., Systolic flow augmentation in hearts ejecting into a model of stiff aging vasculature. Influence on myocardial perfusion-demand balance, *Circulation Research*, Vol.76, No.1 (1995), pp.132-141.
- [3] Christensen, KL., and Mulvany, MJ., Location of resistance arteries, *Journal of Vascular Research*, Vol.38, No.1 (2001), pp.1-12.
- [4] Cheng, C., Helderma, F., Tempel, D., Segers, D., Hierck, B., Poelmann, R., van Tol, A., Duncker, DJ., Robbers-Visser, D., Ursem, NT., van Haperen, R., Wentzel, JJ., Gijzen, F., van der Steen, AF., de Crom, R., and Krams, R., Large variations in absolute wall shear stress levels within one species and between species, *Atherosclerosis*, Vol.195, No.2 (2007), pp.225-235.
- [5] Benetos, A., Safar, M., Rudnichi, A., Smulyan, H., Richard, JL., Ducimetière, P., and Guize, L., 1997, Pulse pressure: a predictor of long-term cardiovascular mortality in a French male population, *Hypertension*, Vol.30, No.6 (2006), pp.1410-1415.
- [6] Mitchell, GF., Moyé, LA., Braunwald, E., Rouleau, JL., Bernstein, V., Geltman, EM., Flaker, GC., and Pfeffer, MA., Sphygmomanometrically determined pulse pressure is a powerful independent predictor of recurrent events after myocardial infarction in patients with impaired left ventricular function. SAVE investigators. Survival and Ventricular Enlargement, *Circulation*, Vol.96, No.12 (1997), pp.4254-4260.
- [7] Safar, ME., Siche, JP., Mallion, JM., and London, GM., Arterial mechanics predict cardiovascular risk in hypertension, *Journal of Hypertension*, Vol.15, No.12 Pt 2 (1997), pp.1605-1611.
- [8] Benbrahim, A., L'Italien, GJ., Milinazzo, BB., Warnock, DF., Dhara, S., Gertler, JP., Orkin, RW., and Abbott, WM., A compliant tubular device to study the influences of wall strain and fluid shear stress on cells of the vascular wall, *Journal of Vascular Surgery*, Vol.20,

- No.2 (1994), pp.184-194.
- [9] Zhao, S., Suciu, A., Ziegler, T., Moore, JE. Jr., Bürki, E., Meister, JJ., and Brunner, HR., Synergistic Effects of Fluid Shear Stress and Cyclic Circumferential Stretch on Vascular Endothelial Cell Morphology and Cytoskeleton, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol.15, No.10, (1995), pp.1781-1786.
- [10] Peng, X., Recchia, FA., Byrne, BJ., Wittstein, IS., Ziegelstein, RC., and Kass, DA., In vitro system to study realistic pulsatile flow and stretch signaling in cultured vascular cells, *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, Vol.279, No.3 (2000), pp.C797-C805.
- [11] Liu, SQ., Yen, M., Fung, YC., On measuring the third dimension of cultured endothelial cells in shear flow, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.91, No.19 (1994), pp.8782-8786.
- [12] 岡 小天, レオロジー—生物レオロジー, *物理化学選書7* (1974), 裳華房.
- [13] Wu, SP., Ringgaard, S., Oyre, S., Hansen, MS., Rasmus, S., and Pedersen, EM., Wall shear rates differ between the normal carotid, femoral, and brachial arteries: an in vivo MRI study, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, Vol.19, No.2 (2004), pp.188-193.
- [14] Dammers, R., Stiff, F., Tordoir, JH., Hameleers, JM., Hoeks, AP., and Kitslaar, PJ., Shear stress depends on vascular territory: comparison between common carotid and brachial artery, *Journal of Applied Physiology*, Vol.94, No.2 (2003), pp.485-489.
- [15] Caro, CG., TJ., Pedley, RC., Schroter, WA., Seed: The Mechanics of the Circulation, *Oxford University Press* (1978), pp.350-433.
- [16] Kamiya, A., Bukhari, R., and Togawa, T., Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function, *Bulletin of Mathematical Biology*, Vol.46, No.1 (1984), pp.127-137.
- [17] Talbot, L., Berger, SA., Fluid-mechanical aspects of the human circulation, *American Scientist*, Vol.62, No.6 (1984), pp.127-137.
- [18] Schmid-Schönbein, GW., Murakami, H., Blood flow in contracting arterioles, *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental*, Vol.4, No.4 (1985), pp.311-328.
- [19] Naumann, A., Schmid-Schönbein, H., Schönbein, Schettler, G., ed., A fluid-dynamicist's and a physiologist's look at arterial flow and arteriosclerosis, *Fluid Dynamics as a*

Localizing Factor for Atherosclerosis (1983), Springer-Verlag, Heiderberg, Berlin.

- [20] 山口 隆美, コンピューターによる血流の解析—血管病変と血流の研究における数値流体力学の基礎と応用, *病理と臨床* (1993), 第11巻, 784-795頁.
- [21] Back, LD., Radbill, JR., Crawford, DW., Analysis of pulsatile, viscous blood flow through diseased coronary arteries of man, *Journal of Biomechanics*, Vol.10, No.5-6 (1977), pp.339-353.
- [22] Strony, J., Beaudoin, A., Brands, D., Adelman, B., Analysis of shear stress and hemodynamic factors in a model of coronary artery stenosis and thrombosis, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Vol.265, No.5 Pt 2 (1993), pp.H1787-H1796.
- [23] Lipowsky, HH., Usami, S., Chien, S., In vivo measurements of "apparent viscosity" and microvessel hematocrit in the mesentery of the cat, *Microvascular Research*, Vol.19, No.3 (1980), pp.297-319.
- [24] Cornelissen, AJ., Dankelman, J., VanBavel, E., Stassen, HG, and Spaan, JA., Myogenic reactivity and resistance distribution in the coronary arterial tree: a model study, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, Vol.278, No.5 (2000), pp.H1490-H1499.
- [25] Dobrin, PB., Caro, CG, Pedley, TJ., Schroter RC., Seed WA., eds., Mechanical properties of arteries, *The Mechanics of the Circulation* (1978), pp.397-460. Oxford University Press, New York
- [26] Bussolari, SR., Dewey, CF., and Gimbrone, MA., Apparatus for subjecting living cells to fluid shear stress, *Review of Scientific Instruments*, No.53, No.12 (1982), pp.1851-1854.
- [27] Nomura, H., Ishikawa, C., Komatsuda, T., Ando, J., and Kamiya, A., A disk-type apparatus for applying fluid shear stress on cultured endothelial cell, *Biorheology*, Vol.25, No.3 (1988), pp.461-470.
- [28] Stathopoulos, NA., HellumsShear, JD., stress effects on human embryonic kidney cells in vitro, *Biotechnology and Bioengineering*, Vol.27, No.7 (1985), pp.1021-1026.
- [29] Viggers, RF., Wechezak, AR., and Sauvage, LR., An apparatus to study the response of cultured endothelium to shear stress, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol.108, No.4

(1986), pp.332-337.

- [30] Koslow, AR., Stromberg, RR., Friedman, LI., Lutz, RJ., Hilbert, SL., and Schuster, P., A flow system for the study of shear forces upon cultured endothelial cells, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol.108, No.4 (1986), pp.338-341.
- [31] Moore, JE., Jr., Bürki, E., Suciu, A., Zhao, S., Burnier, M., Brunner, HR., Meister, JJ., A device for subjecting vascular endothelial cells to both fluid shear stress and circumferential cyclic stretch, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol.22, No.4 (1994), PP.416-422.
- [32] Sumpio, BE., Banes, AJ., Levin, LG., and Johnson, G., Mechanical stress stimulates aortic endothelial cells to proliferate, *Journal of Vascular Surgery*, Vol.6, No.3 (1987), pp.252-256.
- [33] Naruse, K., Sokabe, M., Involvement of stretch-activated ion channels in Ca²⁺ mobilization to mechanical stretch in endothelial cells. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, Vol.264, No.4 Pt 1 (1993), pp.C1037-C1044.
- [34] Hishikawa, K., Nakaki, T., Suzuki, H., Saruta, T., and Kato, R., Transmural pressure inhibits nitric oxide release from human endothelial cells, *European Journal of Pharmacology*, Vol.215, No.2-3 (1992), pp.329-331.
- [35] Hishikawa, K., Nakaki, T., Marumo, T., Suzuki, H., Kato, R., and Saruta, T., Pressure enhances endothelin-1 release from cultured human endothelial cells, *Hypertension*, Vol.25, No.3 (1995), pp.449-452.
- [36] Sugaya, Y., Sakamoto, N., Ohashi, T., Sato, M., Elongation and Random Orientation of Bovine Endothelial Cells in Response to Hydrostatic Pressure: Comparison with Response to Shear Stress, *JSME International Journal Series C Mechanical Systems, Machine Elements and Manufacturing*, Vol. 46, No.4 (2003), pp.1248-1255.
- [37] Ohashi T, Sugaya Y, Sakamoto N, Sato M., Hydrostatic pressure influences morphology and expression of VE-cadherin of vascular endothelial cells, *Journal of Biomechanics*, Vol.40, No.11 (2007), pp.2399-2405.
- [38] Westerhof, N., Elzinga, G., and Sipkema, P., An artificial arterial system for pumping hearts, *Journal of Applied Physiology*, Vol.31, (1971), pp. 776-781.

- [39] Toorop, GP., Westerhof, N., Elzinga, G., Beat-to-beat estimation of peripheral resistance and arterial compliance during pressure transients, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, Vol.252, No. 21 (1987), pp.H1275-H1283.
- [40] Stergiopoulos, N., Meister, JJ., and Westerhof, N., Evaluation of methods for the estimation of total arterial compliance, *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, Vol.268, No.37 (1995), pp.H1540-H1548.
- [41] A. C. Burton, Handbook of Physiology, Section 2, Vol.1, Chap.6 (1963).
- [42] Armentano, RL., Barra, JG., Levenson, J., Simon, A., and Pichel, RH., Arterial wall mechanics in conscious dogs. Assessment of viscous, inertial, and elastic moduli to characterize aortic wall behavior, *Circulation Research*, Vol.76, No.3 (1995), pp.468-78.
- [43] Naiki, T., Hayashi, K., and Takemura, S., An LDA and flow visualization study of pulsatile flow in an aortic bifurcation model, *Biorheology*, Vol.32, No.1 (1995), pp.43-59.
- [44] Reneman, RS., Arts, T., and Hoeks, AP., Wall shear stress--an important determinant of endothelial cell function and structure--in the arterial system in vivo. Discrepancies with theory, *Journal of Vascular Research*, Vol.43, No.3, (2006), pp. 251-269.
- [45] Ziegler, T., Bouzourène, K., Harrison, VJ., Brunner, HR., and Hayoz, D., Influence of oscillatory and unidirectional flow environments on the expression of endothelin and nitric oxide synthase in cultured endothelial cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(5) 1998, pp.686-692.

第5章 血管内皮細胞形態における血行力学的応力の影響

5.1 緒言

ヒトの体には細かく分類すると 200 種類にも及ぶ細胞が存在し、上皮、結合組織、筋、神経組織などの各組織中でそれぞれ分化した機能を果たし、組織や器官の構造と機能を維持している。これら様々な種類の細胞の中で、生体内で力学的負荷を担う組織に存在する細胞、あるいは力学的環境の変化に曝されながら機能している細胞は限られており、その一つに血管内皮細胞がある。血管内皮細胞の機能が、生化学物質のみならず血行力学的応力によっても調節を受けることは述べてきた。歴史的に見ると、力学的刺激に対する血管内皮細胞の応答が最初に確認されたのは形態的リモデリングであった。例えば、血流の速い部位では流れの向きに細長く伸びて配向し、血流が遅いか流れのパターンが複雑であると考えられる部位では比較的丸い形態をしている、といった観察結果から、内皮細胞の形態が血流の影響を受けることが考えられていた。しかし、実験によってそれらの推論が証明されたのは近年のことであり、また剪断応力や伸展張力が内皮細胞形態に与える影響は数多くの知見があるが、貫壁性圧力が内皮細胞形態に与える影響や、それら応力の複合的な影響は未だ十分に理解されていない。そこで本章では、前章で開発した拍動性灌流装置を用いて貫壁性圧力や剪断応力との複合的な応力が内皮細胞形態に及ぼす影響を検討することで本装置の有用性を確認した。

5.2 血行力学的応力に対する内皮細胞応答

5.2.1 血行力学的応力に対する細胞形態と細胞配向性の変化

血管内皮細胞の形態は血管部位により異なっている。血流の速いところでは血管内皮細胞は長円形で、その長軸を血流方向に向けて配列している。一方、血管分岐部など血流が遅く、あるいは停滞するところでは類円形で、一定の配列方向を示さない[1]-[3]。

この血管の部位による血管内皮細胞の形態や配列の違いにおける原因の一つには、血流に起因する剪断応力にある。Flaherty らは、イヌの大動脈の一部を摘出して軸方向に切り開いた後に、軸方向とは直角に位置している縁同士を縫い合わせ、円筒状に再形成した組織を摘出した部位に戻して移植し、経時的な内皮細胞の形態変化を観察した[4]。その結果、移植直後は血流に対してほぼ垂直方向に配向していた内皮細胞の核が、時間経過に伴い血流方向に配向を変えることが示された。核と細胞の配向の向きは一致することから、生体内で内皮細胞が血流刺激に応答して形態変化を起こし、流れの方向と平行に配向することが明らかになった。また Langille らは、ウサギの腹部大動脈を絹糸で縛り、元の太さの約 50% の狭窄を作成した[5]。狭窄部直上では血流速度が増大するが、3 日後に狭窄部直上部位の血管内皮細胞は長軸を血流に向けてより細長く変化し、一方、血流の速さと方向が非定常な乱流が生じる狭窄部直下では、狭窄部作成前には観察されていた一定の配列が消失して、形態も丸くなることが走査型電子顕微鏡で確認されている。一方、培養血管内皮細胞に剪断応力を作用させて細胞形態の変化を観察する実験は、すでに 1971 年の Krueger らによって報告されている[6]。Dewey らは、回転円盤型灌流装置を用いて粗密な (subconfluent) 培養ウシ大動脈内皮細胞に 0.1-0.5 Pa の剪断応力を 8 日間負荷しても形態変化が起こらなかったが、0.8 Pa では 2 日目で細胞の形が円形に近い敷石状から紡錘形に伸展し、血流と平行に配向することを示した[7]。そして剪断応力により形態や配向が変化した内皮細胞を静置培養下に戻すと、3-4 時間後から形態が元に戻り始め、3 日でほぼ刺激前の状態と同じになった[8]。この結果は、剪断応力により誘導される細胞形態変化は可逆性であることを示している。こうした細胞形態の変化および復元の過程は、細胞種により差があるとも報告されている[9]。Levesque と Nerem は、平行平板型灌流装置を用い、ウシ大動脈血管内皮細胞に 1, 3, 8.5 Pa の剪断応力を 24 時間負荷し、細胞形態と細胞配向性について検討した[10]。剪断応力により細胞形態は類円形から紡錘形に変わり、長軸を流れの方向に向けて配列するようになるが、形態の変化のほうが早い段階で現れ (1-2 時間)、配向の変化はそれよりも遅れる (4 時間) ことを指摘した。

生体において、血管内皮細胞の形態を決定付ける因子としては、血管内応力のほかに内皮下組織におけるコラーゲンなどの細胞外基質の配向も重要である。Dartsch と Betz は、ミニブタの大動脈血管内皮細胞をコラーゲンコートしたシリコーン膜に培養し、

15%の伸展率を毎分60回で3日間負荷したところ、伸展張力が負荷される方向と直角に長軸を向けて配列することを観察した[11]。また、心臓の左室の流出路にある大動脈弁を覆う血管内皮細胞の配列は、血流方向ではなく、弁が閉じている拡張期に受ける圧力に依存することが知られている[12]。Buckは培養血管内皮細胞の配列が、血管内皮細胞下の細胞外基質の溝や線維の走行に沿った形態追従効果（contact guidance）を受けることを報告している[13]。

5.2.2 血行力学的応力に対する細胞骨格の変化

細胞骨格は、細胞質に張り巡らされたタンパク質繊維のネットワークで、細胞形態の維持や変化、染色体や細胞小器官の移動などの役割を担う構造である。また、細胞に力学的強度を与え、細胞の運動にも大きな役割を果たす。細胞骨格の主な構成要素は、マイクロフィラメント、微小管、中間径フィラメントの3種類である。マイクロフィラメントは、アクチンを主成分とした直径5-9 nmの繊維であり、アクチンフィラメント（F-アクチン）とも呼ばれ、細胞膜直下の表層に多く存在する。また、細胞に力学的刺激が加わると、F-アクチンが集合してストレスファイバと呼ばれる太い束を形成する。このストレスファイバは特に培養細胞で顕著に観察される。また、F-アクチンにミオシンが結合することによって、収縮装置（contractile apparatus）が構成されている。微小管、中間径フィラメントは形態を維持する事を主体としているのに対し、F-アクチンは急激な形態変化について大きな影響を及ぼす。

血管内皮細胞において、細胞骨格は形態や接着、運動あるいは細胞間隙を介する物質の透過性の制御に関わっている。F-アクチンは、血管内皮細胞における integrity の保持のほかに、血管内皮細胞が傷害を受けた後の修復（再生能）にも重要な役割を果たすことが知られている[14], [15]。内皮細胞におけるF-アクチンの分布は、上述した細胞形態と同様、血管の部位により異なっている。すなわち、局所の血流状態を反映したものとなっている。Kimらは、ウサギ大動脈内皮細胞のF-アクチンをローダミンファロイジンで染色し血管部位による違いを検討した[16]。腹部大動脈の分岐部で、速い血流が作用する分岐部直後の内壁の内皮では、血流方向に太いストレスファイバが形成されるが、血流が遅く、再循環する分岐血管の側壁部では、F-アクチンが細胞の辺縁部に分布した

高密度周縁帯（ペリフェラルバンド）が観察され、ストレスファイバは短くて細い。生体内の血管では、大きい剪断応力に曝される大動脈、心臓の左心室、大動脈弁にストレスファイバを伴う血管内皮細胞が観察される[17],[18]。血流が増加するとストレスファイバが増加する。Masuda らは、イヌの総頸動脈と外頸動脈間に吻合を作成し、血流量を増加させて血管内皮細胞のマイクロフィラメントの変化を、透過型電子顕微鏡を使って観察した[19]。流速が2倍以上増加した動脈内皮では、1週間で径が6-7 nmのストレスファイバが血流方向を向いて細胞内下部に増加し、2-4週ではその数がさらに増加、4-7ヶ月の慢性期では特に細胞間の接着部に増加してくるのを観察している。

5.2.3 血行力学的応力に対する細胞間接着の変化

血管内皮細胞は隣り合う細胞同士が互いに接着することで単層を成しており、血管内皮細胞の細胞間接着は血管の恒常性維持に重要である。血管内皮細胞の細胞間接着は、密着結合、接着結合、デスモゾーム結合、ギャップ結合から構成されている。その中でも接着結合は、隣り合う細胞同士が接触した後、早期に形成され、他の結合の形成に重要な役割を果たすと言われている[20],[21]。接着結合は、隣り合う細胞の細胞膜表面に突き出したカドヘリンと呼ばれる膜貫通タンパク質同士が、カルシウムイオンの存在下で同種結合したタンパク質複合体である[22]。カドヘリンは、細胞内でカテニンというタンパク質を介して、細胞骨格分子であるアクチン繊維と結合している[22],[23]。血管内皮細胞においては、VE-カドヘリン（カドヘリン-5）が細胞特異的に発現しており[24],[25]、VE-カドヘリンは、血管の整合性[26]や血管形成、血管透過性、白血球浸潤の制御に関与している[27]、

VE-カドヘリンは、細胞形態やF-アクチン同様に血流の影響を受ける。血流が一方向で比較的安定している胸部下行大動脈や腹部大動脈では血管内皮細胞の境界面で強く発現しているのに対し、血流が壁から剥離したり、渦や逆流が生じたりしている大動脈弓や狭窄後拡張部位ではVE-カドヘリンの発現は弱い[28]。

5.3 試料と方法

5.3.1 細胞培養

ヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) はCambrex Bio Science Walkersville (MD, USA) で購入し, EGM-2 SingleQuot kit (Cambrex Bio Science Walkersville) を加えたEBM-2 base medium (Cambrex Bio Science Walkersville) を用いて, 5% CO₂, 湿度 100% 37 °Cで培養した. 実験で使用する細胞はType-I コラーゲン (0.27 mg/ml: Nitta Gelatin, Osaka, Japan)-でコートした 35 mm culture dishes (Asahi technoglass, Tokyo, Japan) に播種し, confluent になるまで育てた. 細胞は 6 および 7 継代目を使用した.

5.3.2 実験条件

前章で開発した拍動流灌流装置を用いてHAECに 1) 静水圧負荷 (貫壁性圧力: 100 mmHg, 剪断応力: 0.1 Pa以下), 2) 定常流負荷 (貫壁性圧力: 100 mmHg, 剪断応力: 1.5 Pa), 3) 拍動流 (貫壁性圧力: 80/120 mmHg, 剪断応力: 1.2/1.8 Pa) を 3, 6, 24 時間負荷した際の細胞形態, 細胞骨格, 細胞間接着を検討した. 各応力負荷における本装置のパラメータ R_c , R_p , C は, 1) $R_c = 10 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $R_p = 133 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $C = 14685 \text{ m}^3/\text{mmHg}$, 2) $R_c = 10 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $R_p = 9 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $C = 15498 \text{ m}^3/\text{mmHg}$, 3) $R_c = 10 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $R_p = 9 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $C = 2883 \text{ m}^3/\text{mmHg}$ とした.

5.3.3 細胞形態観察および解析

応力負荷後の HAEC の細胞形態を倒立顕微鏡 (ECLIPSE TE300, Nikon, Tokyo, Japan) で観察した. 内皮細胞の透過画像はデジタルカメラ (Penguin 600CL, Pixera, Osaka, Japan) で撮影した. 内皮細胞の輪郭を手作業で線を引き, 面積 (A), 周囲長 (P), 細胞長 (L), 細胞幅 (W), 細胞配向角 (θ : $-90 \leq \theta < 90$) を Image-Pro PLUS (Nippon Roper, Tokyo, Japan) で計測し, 各パラメータの計測データから真円度を表す shape index (SI : $0 < SI \leq 1$) を算出した. SI は真円では 1 の値を取る. また, 細胞配向角は流れ方向を 0° とした.

$$SI = \frac{4\pi A}{P^2} \quad (5.1)$$

5.3.4 細胞骨格観察

応力負荷後の HAEC における F-アクチンを直接免疫蛍光染色し、その変化を観察した。本装置を用いて HAEC に上述した条件の応力を負荷後、装置から培養ディッシュを外し、新鮮な培地 1 ml で 2 回穏やかに洗浄した。その後、即座に培地を取り除き、4% paraformaldehyde (和光純薬工業) 1 ml を培養ディッシュに添加し、室温で 10 分間静置し細胞を固定した。細胞固定後、paraformaldehyde を取り除き HBSS 1 ml で 3 回洗浄し、終濃度 0.1% に PBS で調整した界面活性剤 Triton X-100 (シグマ) 1 ml を培養ディッシュに添加し、室温で 5 分間静置し、細胞膜透過処理した。浸透処理後、TritonX-100 を取り除き HBSS 1 ml で 3 回洗浄し、培養ディッシュに PBS 1 ml と Alexa FluorR 568 phalloidin (Molecular Probes, 励起波長 : 578 nm, 蛍光波長 : 600 nm) 25 μ l (200 units/ml) を添加し (1:40), 室温で 20 分間静置し反応させ、F-アクチンを標識した。標識後、HBSS 1 ml で 3 回洗浄し、共焦点レーザー顕微鏡にて F-アクチンを観察した。画像は、デジタル CCD スチールカメラ (ORCA-ER, 浜松ホトニクス) にて取得した。

5.3.5 細胞間接着観察

血管内皮細胞に特異的に発現する VE-カドヘリンは、血管内皮細胞間の接着と形態形成に関与することが知られている。応力負荷後の HAEC における VE-カドヘリンを間接免疫蛍光染色し、その変化を観察した。本装置を用いて HAEC に上述した条件の応力を負荷後、装置から培養ディッシュを外し、新鮮な培地 1 ml で 2 回穏やかに洗浄した。その後、即座に培地を取り除き、4% paraformaldehyde (和光純薬工業) 1 ml を培養ディッシュに添加し、室温で 10 分間静置し細胞を固定した。細胞固定後、paraformaldehyde を取り除き HBSS 1 ml で 3 回洗浄し、培養ディッシュに HBSS 1 ml と 1 次抗体 Rabbit Anti-human VE-cadherin Polyclonal Antibody (BMS158, Bender MedSystems) 2 μ l を添加し (1 μ g/ml), 室温で一晩静置し反応させた。VE-カドヘリンと 1 次抗体の反応後、HBSS 1 ml

で3回洗浄し、培養ディッシュに HBSS 1 ml と 2 次抗体 Goat anti-rabbit IgG fluorescein conjugate (Santa Cruz Biotechnology) 2.5 μ l を添加し (1:400)、室温で一晩静置し反応させ、1 次抗体を標識した。標識後、HBSS 1 ml で3回洗浄し、蛍光顕微鏡 (ECLIPSE TE-2000U, ニコン) にて VE-カドヘリンを観察した。画像は、デジタル CCD スチールカメラ (ORCA-ER, 浜松ホトニクス) にて取得した。

5.4 結果

5.4.1 細胞形態観察および解析

HAEC に静水圧 (貫壁性圧力 : 100 mmHg, 剪断応力 : 0.1 Pa 以下) を負荷する前の細胞形態の透過画像を図 5.1 a) に、静水圧を 24 時間負荷後の細胞形態の透過画像を図 5.1 b) に示した。その結果、HAEC の細胞形態は、静水圧負荷前では丸みを帯びていたが、静水圧負荷後では細長く伸展していた。細胞配向性については、静水圧負荷前後で変化はなく、ランダムであった。また、静水圧負荷前では、細胞間に間隙はなく細胞核膜は滑らかだったのに対し、静水圧負荷後では、細胞間に間隙が所々観察されていた。一方、定常流、拍動流負荷後では、静水圧負荷後と同様、HAEC の細胞形態は細長く伸展していたが、細胞配向性については、静水圧負荷前後と異なり、流れ方向に配向していた (図 5.2, 5.3)。

次に、静水圧負荷における HAEC の細胞面積、細胞周囲長、細胞長、細胞幅、細胞配向角の経時的な変化を表 5.1 に示した。その結果、細胞面積、細胞周囲長、細胞長は、静水圧負荷後 6 時間で最大となり、24 時間では減少した。一方、細胞幅は、静水圧負荷時間に依存して減少した。これらの結果から、静水圧負荷 6 時間までは負荷時間に依存して細胞が伸展し細長くなっているが、24 時間の時点では、細胞が多少元に戻っていることが分かる。また、細胞配向角は、ばらつきが若干少なくなったが、ほとんど変化はなく、静水圧負荷後 24 時間でも細胞の配向性はないといえる。

定常流負荷における HAEC の細胞面積、細胞周囲長、細胞長、細胞幅、細胞配向角の経時的な変化を表 5.2 に示した。その結果、細胞面積は、拍動流負荷後で増加しており、時間依存的な変化はなかった。一方、細胞周囲長と細胞長は、定常流負荷時間に依

存して増加し、細胞幅は、定常流負荷時間に依存して減少した。細胞配向角は、ばらつきが静水圧に比べ少なくなり流れの方向への多少の細胞の配向性があるといえる。

拍動流負荷における HAEC の細胞面積、細胞周囲長、細胞長、細胞幅、細胞配向角の経時的な変化を表 5.3 に示した。その結果、細胞面積、細胞周囲長、細胞長ともに、拍動流負荷時間に依存して増加した。一方、細胞幅は、拍動流負荷時間に依存して減少した。細胞配向角は、ばらつきが静水圧や定常流に比べより少なくなり流れの方向への細胞が配向しているといえる。

最後に、それぞれの応力負荷時における細胞面積と細胞周囲長から細胞形態の真円度を表す SI を算出した。その結果、 SI はそれぞれの応力負荷時間依存的に減少した。また、応力負荷時間別に静水圧、定常流、拍動流負荷による SI を比較すると、応力負荷 6 時間後までは拍動流、静水圧、定常流負荷の順に SI が小さいのに対し、応力負荷 24 時間後では、拍動流、定常流、静水圧負荷の順に SI が小さくなり、定常流と静水圧負荷で逆転が生じた。

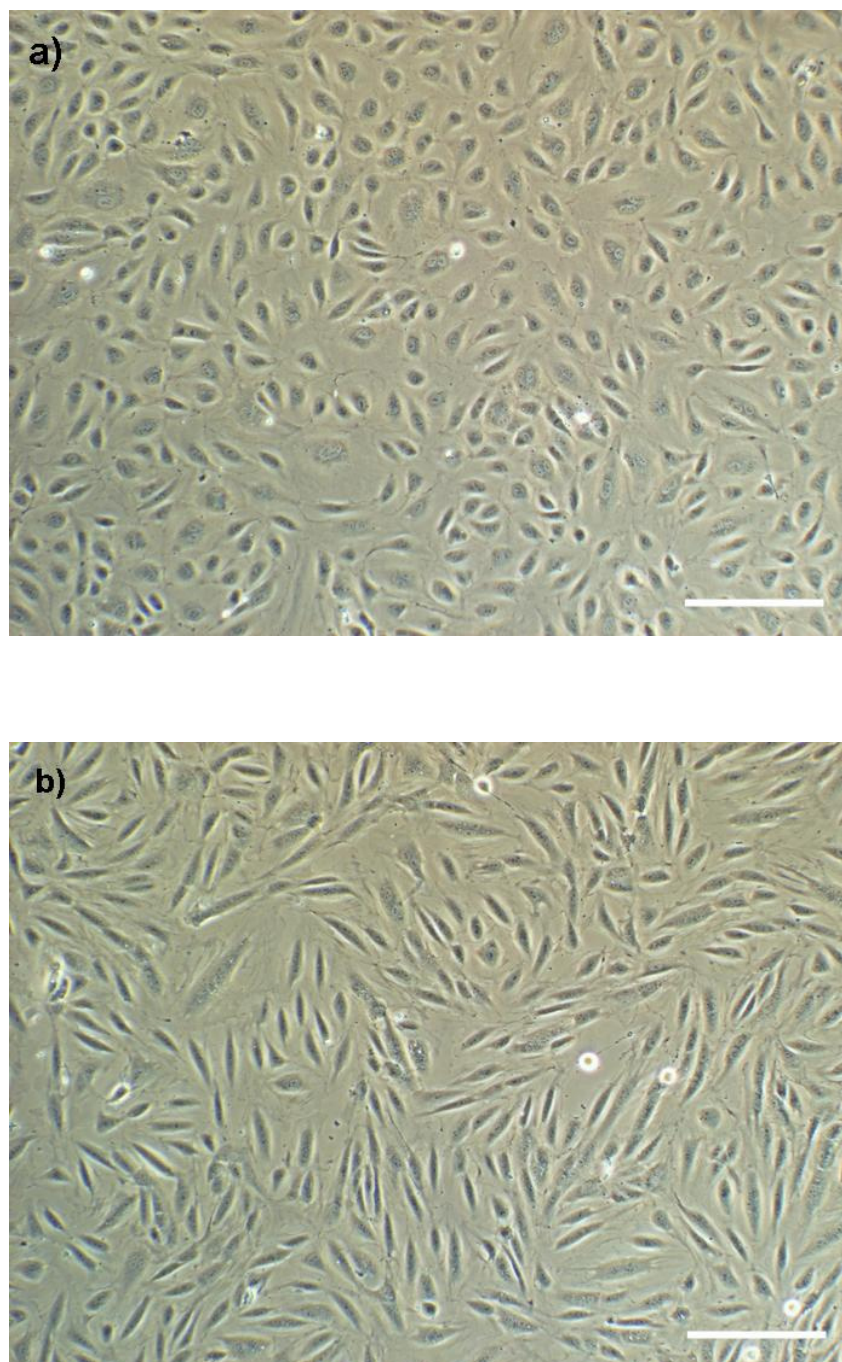


図 5.1 静水圧負荷における細胞形態変化

a) 静水圧負荷前, b) 静水圧負荷 24 時間後, スケールバーは 200 μm , 流れ方向は左から右.

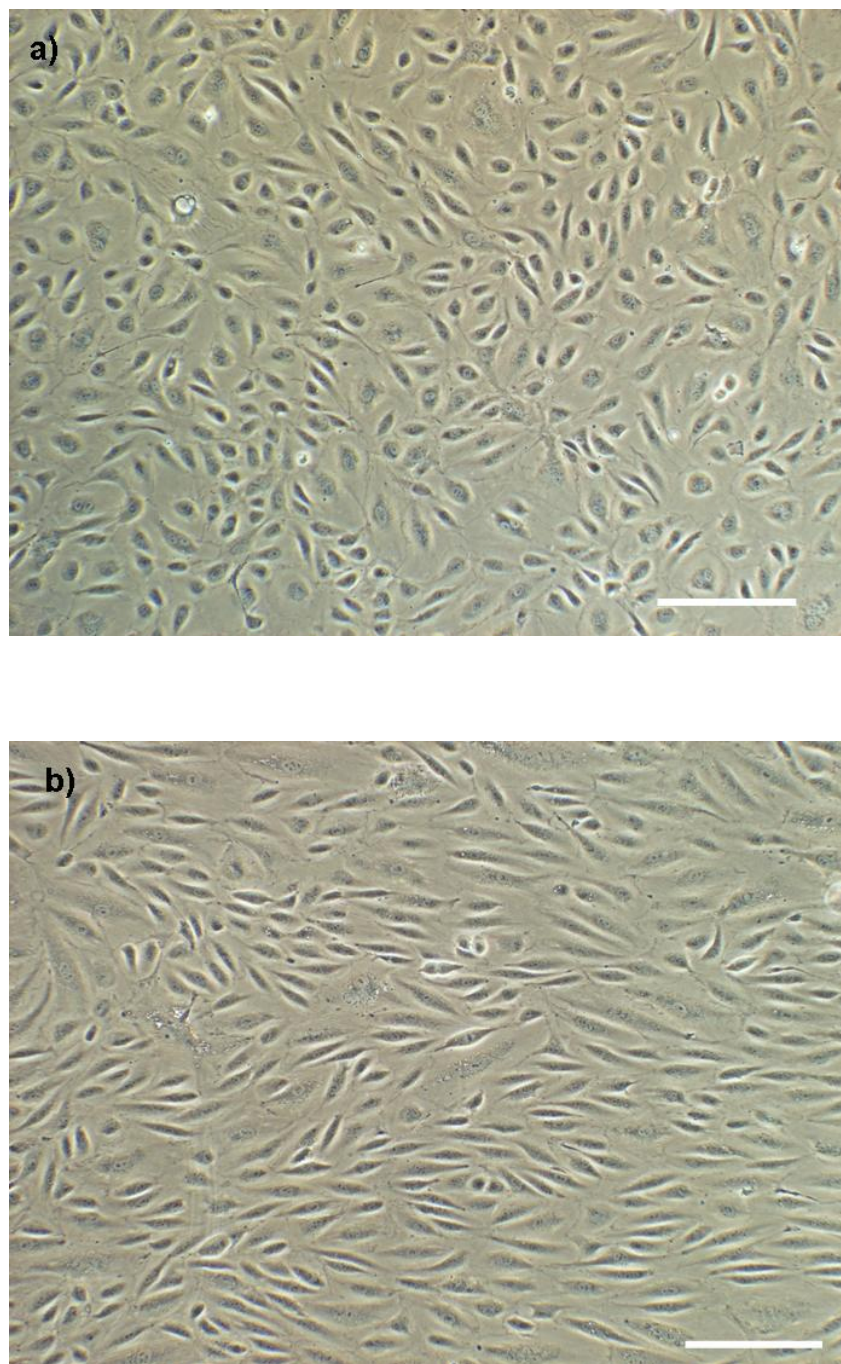


図 5.2 定常流負荷における細胞形態変化

a) 定常流負荷前, b) 定常流負荷 24 時間後, スケールバーは 200 μm , 流れ方向は左から右.

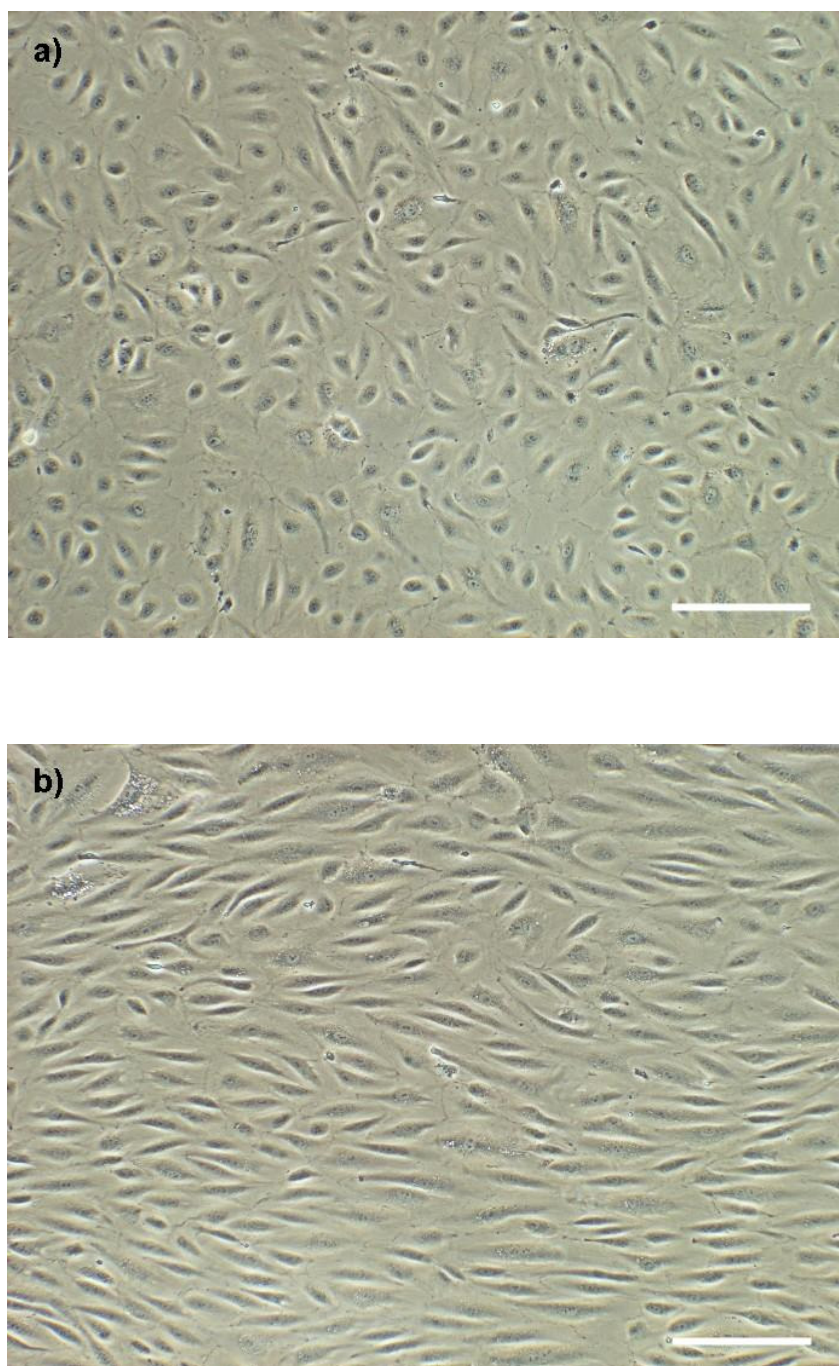


図 5.3 拍動流負荷における細胞形態変化

a) 拍動流負荷前, b) 拍動流負荷 24 時間後, スケールバーは 200 μm , 流れ方向は左から右.

表 5.1 静水圧負荷における細胞形態の時間別計測データ

応力負荷時間	$A (\mu\text{m}^2)$	$P (\mu\text{m})$	$L (\mu\text{m})$	$W (\mu\text{m})$	$\theta (^{\circ})$
0 時間	2624 ± 1285	216 ± 23	75 ± 9	44 ± 5	0 ± 52
3 時間	3093 ± 1514	257 ± 59	108 ± 28	36 ± 9	-15 ± 52
6 時間	3291 ± 952	275 ± 45	117 ± 23	36 ± 5	-7 ± 58
24 時間	2603 ± 1391	256 ± 73	112 ± 34	29 ± 9	-1 ± 43

A : 細胞面積, P : 細胞周囲長, L : 細胞長, W : 細胞幅, θ : 細胞配向角, $-90 \leq \theta < 90$

表 5.2 定常流負荷における細胞形態の時間別計測データ

応力負荷時間	$A (\mu\text{m}^2)$	$P (\mu\text{m})$	$L (\mu\text{m})$	$W (\mu\text{m})$	$\theta (^{\circ})$
0 時間	2624 ± 1285	216 ± 23	75 ± 9	44 ± 5	0 ± 52
3 時間	2781 ± 1044	240 ± 45	98 ± 20	36 ± 8	6 ± 45
6 時間	3310 ± 1264	268 ± 51	111 ± 22	38 ± 8	9 ± 50
24 時間	3273 ± 1378	299 ± 68	132 ± 31	32 ± 8	2 ± 39

A : 細胞面積, P : 細胞周囲長, L : 細胞長, W : 細胞幅, θ : 細胞配向角, $-90 \leq \theta < 90$

表 5.3 拍動流負荷における細胞形態の時間別計測データ

応力負荷時間	$A (\mu\text{m}^2)$	$P (\mu\text{m})$	$L (\mu\text{m})$	$W (\mu\text{m})$	$\theta (^{\circ})$
0 時間	2624 ± 1285	216 ± 23	75 ± 9	44 ± 5	0 ± 52
3 時間	2955 ± 1232	265 ± 57	112 ± 27	34 ± 7	9 ± 48
6 時間	2810 ± 971	260 ± 47	113 ± 22	32 ± 7	22 ± 34
24 時間	2905 ± 1201	299 ± 71	132 ± 32	29 ± 7	2 ± 21

A : 細胞面積, P : 細胞周囲長, L : 細胞長, W : 細胞幅, θ : 細胞配向角, $-90 \leq \theta < 90$

表 5.4 静水圧, 定常流, 拍動流負荷における時間別 Shape Index

応力負荷時間	静水圧負荷	定常流負荷	拍動流負荷
0 時間	0.68 ± 0.10	0.68 ± 0.10	0.68 ± 0.10
3 時間	0.56 ± 0.07	0.59 ± 0.08	0.52 ± 0.08
6 時間	0.54 ± 0.07	0.56 ± 0.06	0.51 ± 0.08
24 時間	0.51 ± 0.07	0.45 ± 0.07	0.40 ± 0.07

5.4.2 細胞骨格分子観察

図 5.4 に静水圧負荷時間ごとの F-アクチンの蛍光染色画像を示した。その結果、応力を負荷しない場合では、細胞辺縁部にペリフェラルバンドと呼ばれる細く短い線維が観察された (図 5.4 a)。一方、静水圧負荷後では、細胞辺縁部にあったペリフェラルバンドは徐々に減少し、同時に、細胞の長軸方向の外側から、中心部に向かってストレスファイバが徐々に形成されていく過程が観察された (図 5.4 b, c)。最終的には、静水圧負荷 24 時間後で細胞全体に太いストレスファイバが形成され、ペリフェラルバンドは消失した。

図 5.5 に定常流負荷時間ごとの F-アクチンの蛍光染色画像を示した。その結果、定常流負荷 3, 6 時間後ではストレスファイバはほとんど形成されていなかった。また、定常流負荷 3, 6 時間後では、ペリフェラルバンドの減少も認められなかった (図 5.5 b, c)。定常流負荷 24 時間後では、F-アクチンが 3, 6 時間後と比べ細胞辺縁部から細胞境界部に集約されており、また、静水圧負荷に比し、弱いストレスファイバの形成も認められた (図 5.5 d)。

図 5.6 に拍動流負荷時間ごとの F-アクチンの蛍光染色画像を示した。その結果、拍動流負荷 3 時間後においてペリフェラルバンドの減少とストレスファイバの形成が認められた (図 5.6 b)。その後、拍動流負荷 6 時間後では、ストレスファイバの形成に発達は認められず、むしろ減少していた (図 5.6 c)。最終的に拍動流負荷 24 時間後には、細胞境界部における F-アクチンの集積と、弱いストレスファイバの形成が認められた (図 5.6 d)。

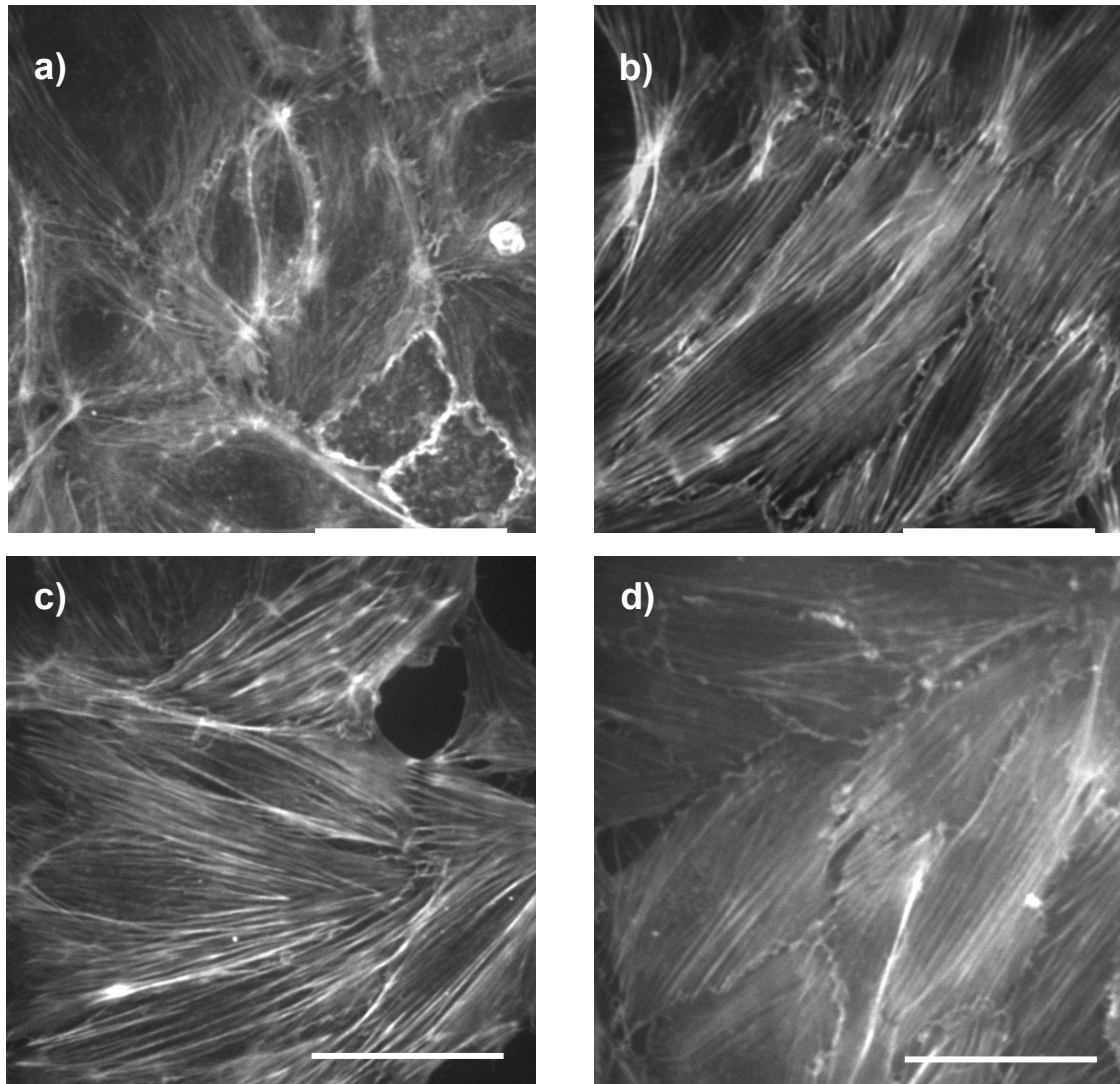


図 5.4 静水圧負荷における F-アクチン変化

a) 静水圧負荷前, b) 静水圧負荷 3 時間後, c) 静水圧負荷 6 時間後, d) 静水圧負荷 24 時間後,
スケールバーは 50 μm , 流れ方向は左から右.

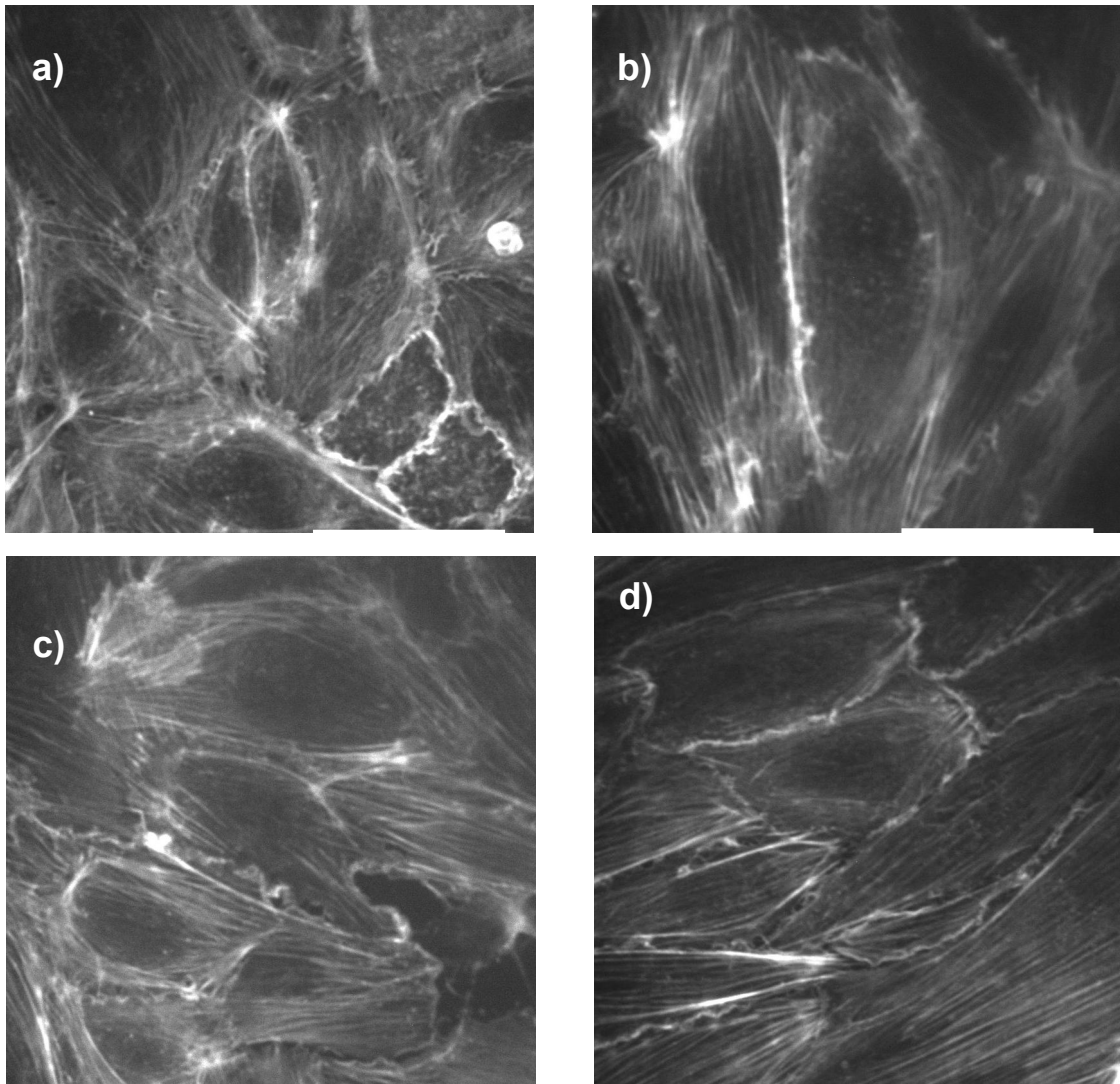


図 5.5 定常流負荷における F-アクチン変化

a) 定常流負荷前, b) 定常流負荷 3 時間後, c) 定常流負荷 6 時間後, d) 定常流負荷 24 時間後,
スケールバーは 50 μm , 流れ方向は左から右.

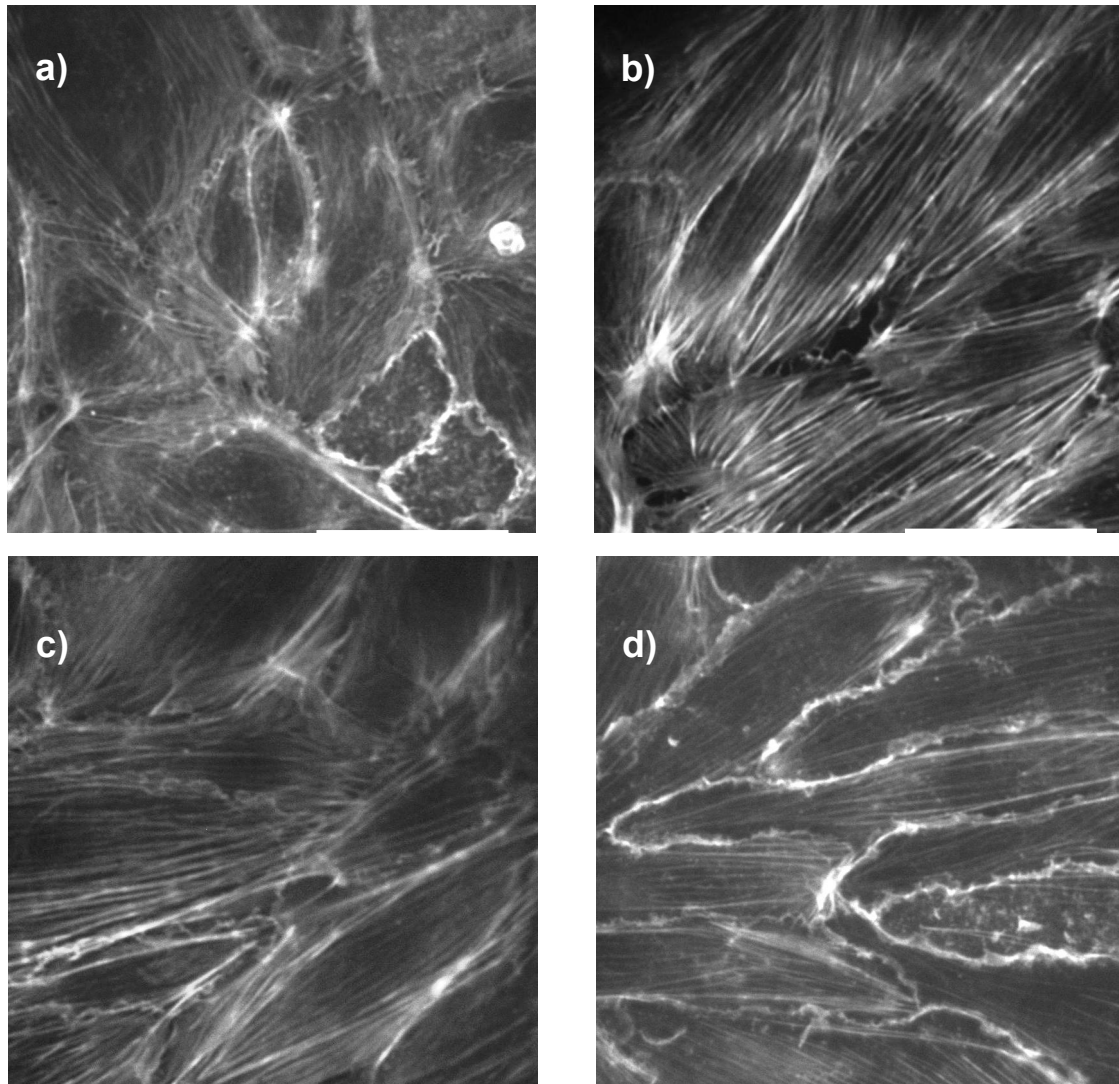


図 5.6 拍動流負荷における F-アクチン変化

a) 拍動流負荷前, b) 拍動流負荷 3 時間後, c) 拍動流負荷 6 時間後, d) 拍動流負荷 24 時間後,
スケールバーは 50 μm , 流れ方向は左から右.

5.4.3 細胞間接着分子観察

静水圧負荷時間ごとの VE-カドヘリンの蛍光染色画像を図 5.7 に示した。その結果、応力を負荷しない場合には、細胞同士の境界面に鮮明かつ連続的な VE-カドヘリンの発現が観察された (図 5.7 a)。一方、静水圧負荷 3 時間後では、細胞境界面にほとんど VE-カドヘリンの発現が観察されなかった (図 5.7 b)。また、静水圧負荷 6 時間後では、細胞境界面に再び VE-カドヘリンの発現が観察されたが、その発現部位は滑らかではなく、波打っている (ruffling) 様子が観察された (図 5.7 c)。最終的に 24 時間後では、細胞境界面の ruffling が更新し、さらに断続的に VE-カドヘリンが発現していた。(図 5.7 d)。

次に、定常流負荷時間ごとの VE-カドヘリンの蛍光染色画像を図 5.8 に示した。その結果、静水圧負荷同様、定常流負荷 3 時間後では細胞境界面が鮮明でなく、VE-カドヘリンの発現が減少していることが示された (図 5.8 b)。また、6 時間後では、再び細胞境界面における VE-カドヘリンの発現が認められたが、その境界面は滑らかではなく、波打っている部分が確認された (図 5.8 c)。最終的に 24 時間後では定常流負荷前以上にまで VE-カドヘリンの発現は回復し、細胞境界面も定常流負荷前と同様に滑らかであった (図 5.8 d)。

最後に、拍動流負荷時間ごとの VE-カドヘリンの蛍光染色画像を図 5.9 に示した。その結果、静水圧負荷や定常流負荷と同様、拍動流負荷 3 時間後では細胞境界面が鮮明でなく、VE-カドヘリンの発現が減少していることが示された (図 5.9 b)。また、6 時間後では、再び細胞境界面における VE-カドヘリンの発現が認められたが、その境界面は滑らかではなく、波打っている部分が確認された (図 5.9 c)。最終的に 24 時間後では拍動流負荷前程度にまで VE-カドヘリンの発現は回復し、細胞境界面も拍動流負荷前と同様に滑らかであった (図 5.9 d)。

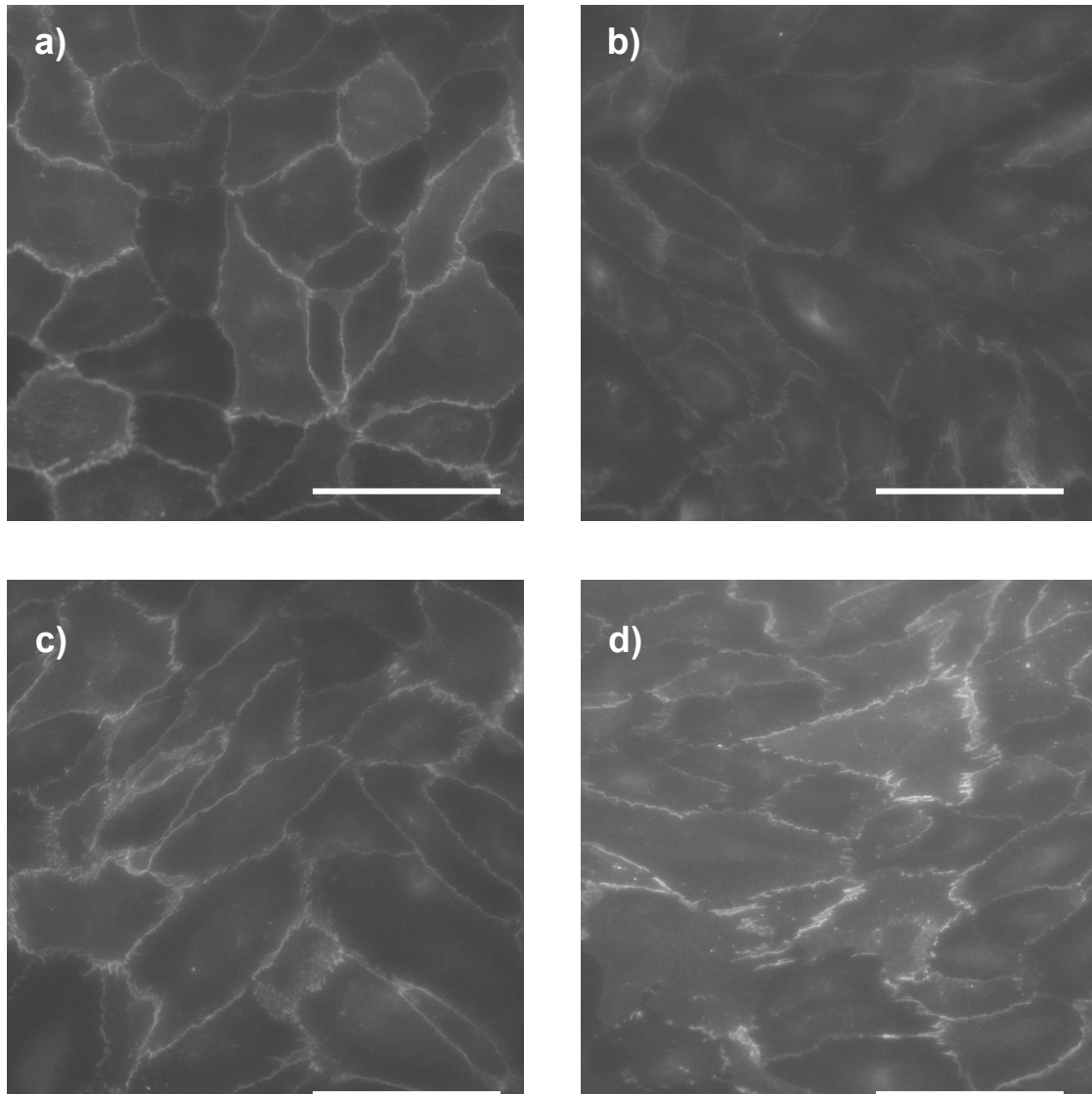


図 5.7 静水圧負荷における VE-カドヘリン変化

a) 静水圧負荷前, b) 静水圧負荷 3 時間後, c) 静水圧負荷 6 時間後, d) 静水圧負荷 24 時間後,
スケールバーは 50 μm , 流れ方向は左から右.

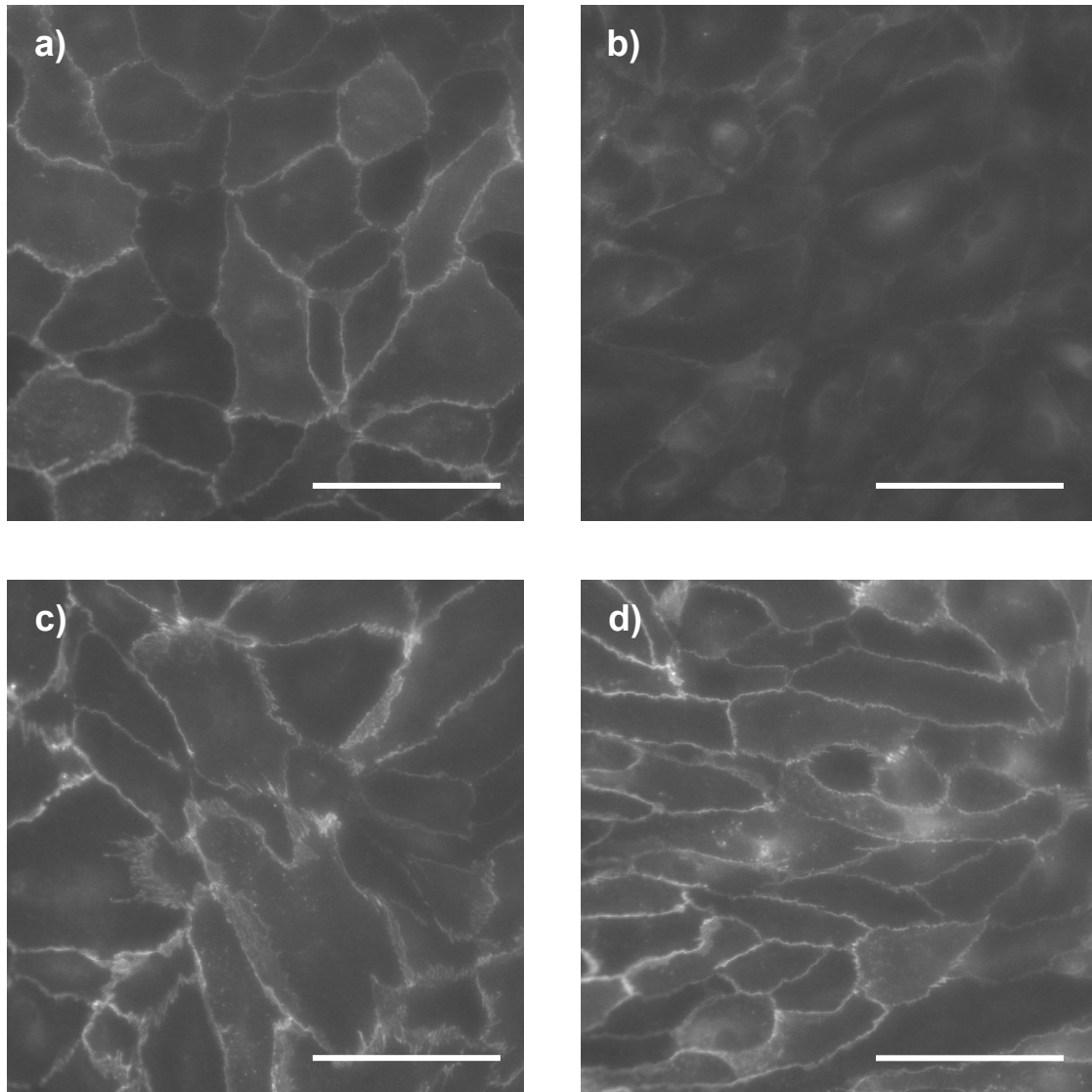


図 5.8 定常流負荷における VE-カドヘリン変化

a) 定常流負荷前, b) 定常流負荷 3 時間後, c) 定常流負荷 6 時間後, d) 定常流負荷 24 時間後,
スケールバーは 50 μm , 流れ方向は左から右.

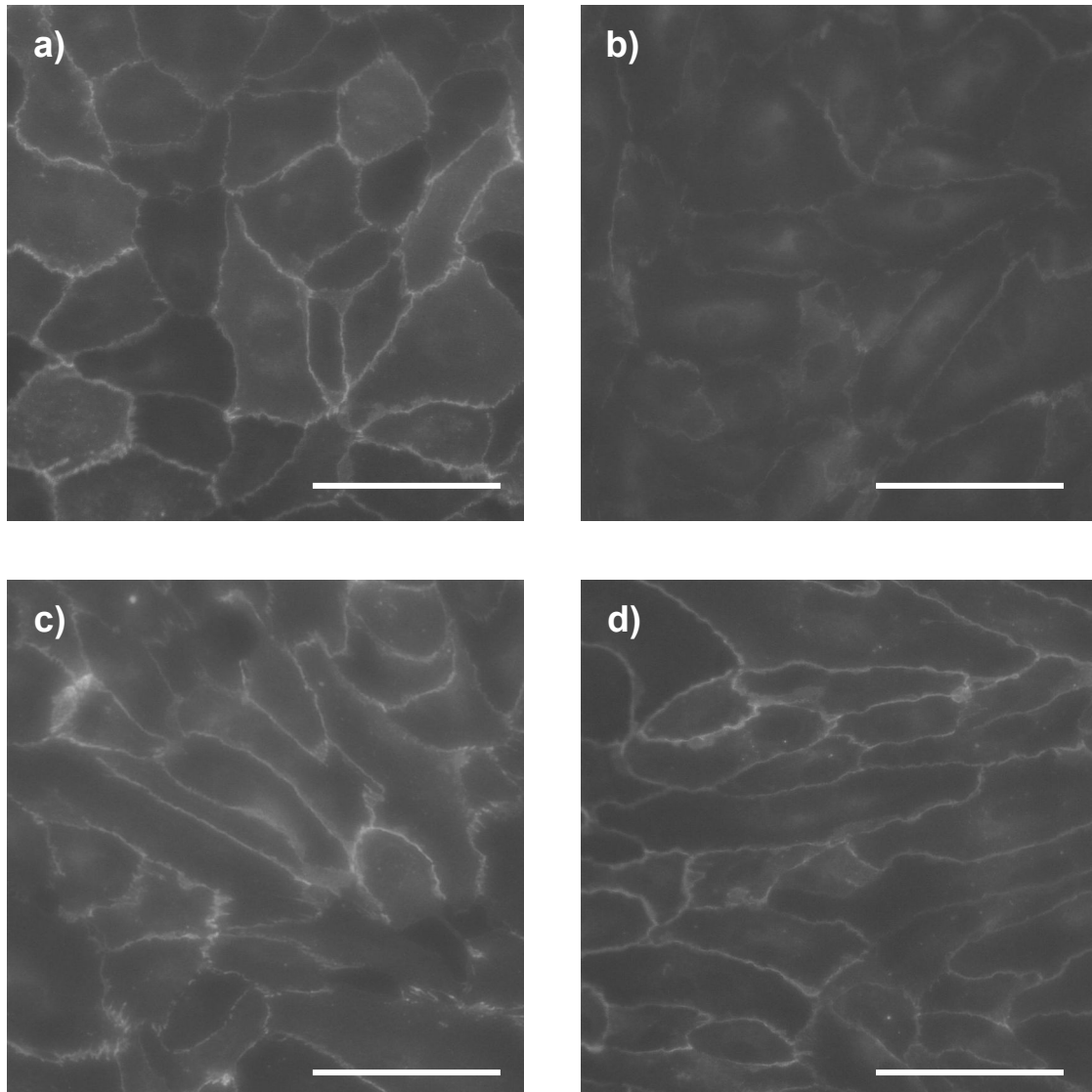


図 5.9 拍動流負荷における VE-カドヘリン変化

a) 拍動流負荷前, b) 拍動流負荷 3 時間後, c) 拍動流負荷 6 時間後, d) 拍動流負荷 24 時間後,
スケールバーは 50 μm , 流れ方向は左から右.

5.5 考察

5.5.1 単独応力負荷と複合応力負荷の違い

本章では、培養血管内皮細胞の細胞形態と配向性、細胞骨格、細胞間接着に対する単独応力負荷と複合応力負荷の違いを、静水圧負荷（貫壁性圧力：100 mmHg, 剪断応力：0.1 Pa 以下）と定常流負荷（貫壁性圧力：100 mmHg, 剪断応力：1.5 Pa）を比較することで検討した。Sugaya らは、水柱圧差を利用し、本章で扱った静水圧負荷同等の応力を培養ウシ大動脈血管内皮細胞に 24 時間負荷した[29]。その結果、細胞は配向性を持たずに伸展したと報告している。また、F-アクチンにおいては、静水圧負荷により細胞の長軸方向に沿って長くて太いストレスファイバが形成されたと報告している。一方、VE-カドヘリンについては、同様の実験系を用いて Ohashi らが検討している[30]。その結果、静水圧負荷前では細胞の辺縁に沿って連続的かつ線上に VE-カドヘリンが観察されたのに対し、静水圧負荷後では疎らになり、多くは細胞辺縁部で観察されたが、一部は細胞内で観察され、負荷前よりも全体的な蛍光は弱く観察された。さらにウエスタンブロットによる VE-カドヘリンのタンパク質量を調べた結果、静水圧負荷により減少していたことが分かった。本章における静水圧負荷実験の結果は、これら先行研究の報告と一致しており、本装置を用いて所望の応力が培養血管内皮細胞に負荷されていることが示された。

本章では取り扱わなかったが、剪断応力負荷における培養血管内皮細胞の細胞形態と配向性、細胞骨格、細胞間接着に関する検討は数多く報告されている。培養ウシ大動脈内皮細胞（BAEC）に剪断応力を負荷した際、細胞は伸展し、流れの向きと平行に配向する。また、剪断応力負荷前では細胞を縁取るように周縁部に多く存在していた F-アクチンは消失し、ストレスファイバが顕著に観察される[31]。さらに VE-カドヘリンは細胞周縁部に連続的に発現することが報告されている[28]。Noria らは、豚胸大動脈から分離・精製した血管内皮細胞に 1.5 Pa の剪断応力を 8.5, 24, 48 時間負荷した際の F-アクチンと VE-カドヘリンの変化を検討している。その結果、剪断応力負荷 8.5 時間後では、細胞間に間隙が観察され、ペリフェラルバンドは減少し、ストレスファイバがランダムに分布していた。また、VE-カドヘリンは断続的であり、細胞同士が接着してい

る部分のみに発現していた。剪断応力負荷 24, 48 時間後では、細胞同士は連続的に配列しており、ペリフェラルバンドはほとんど観察されず、長くて太いストレスファイバが細胞の長軸に沿って形成されていた。また、VE-カドヘリンは細胞周縁部に短い線として分布していた。本実験結果とこれらの報告から、静水圧もしくは剪断応力の単独応力負荷では、細胞配向性は異なるが、細胞形態、F-アクチン、VE-カドヘリンの変化に同様の傾向が観察されることが示された。

次に、本章では貫壁性圧力と剪断応力の複合応力（定常流）を負荷した際の培養血管内皮細胞の細胞形態と配向性、細胞骨格、細胞間接着を検討した。その結果、細胞同士が連続的に繋がり、流れ方向に平行して配向した。また、F-アクチンはペリフェラルバンドとストレスファイバともに観察されたが、ストレスファイバは単独応力負荷時よりも細いストレスファイバが形成されていた。また、VE-カドヘリンは、単独応力負荷で観察された断続的な分布や、流れ方向と垂直な細胞周縁部に観察された流れ方向と平行の短い線は観察されず、応力を負荷しない場合と同様に、細胞周縁部全体で連続的かつ線上に観察された。これらの本実験結果および先行研究から、貫壁性圧力もしくは剪断応力の単独応力負荷では血管内皮細胞の細胞間接着が弱くなっているが、貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷では細胞間接着が維持されていることが考えられる。また、Kimらは、ウサギ腹部大動脈に絹糸で径が60%減少する狭窄を作成し、2週間後同部位を取り出し、血管内皮細胞のF-アクチンをローダミンファロイジンで染色した[33]。その結果、狭窄部から離れた正常部位では細胞の輪郭を描くように周縁に分布し、細胞中央には短く薄いF-アクチンの束が観察された。一方、正常部位の15倍の剪断応力が負荷された狭窄部直上では、細胞周縁部にはF-アクチンは観察されず、細胞中央に流れ方向に配列した長く太いストレスファイバが観察された。これらの結果は、剪断応力が大きくなると細胞周縁部にあったアクチンが中心部に移動し、束になってストレスファイバを形成し、内皮下マトリックスとの接合を強化するといった細胞骨格の再構成が起こることを意味している。よって、本章で検討した貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷の結果は、生体内における正常のF-アクチン分布を再現したことが示され、生体内では、剪断応力と貫壁性圧力の複合応力が重要な役割を果たしていると考えられる。

静水圧負荷と定常流負荷においてSIを比較すると、応力負荷3, 6時間後では静水圧負荷の方がより伸展したのに対し、24時間後では定常流負荷の方がより伸展した。ま

た24時間後では、静水圧負荷の方がよりストレスファイバが強く形成されていた。しかし、細胞骨格は、適切なストレス状態に到達するまで、伸展することでストレス濃度を減らすように発達することが知られている[29]。このことから、総圧としてはほとんど変わらない静水圧負荷と定常流負荷で伸展の度合いが違い、さらに負荷時間により伸展度合いの大小が逆転するのはどうしてだろうか。本実験より、静水圧負荷では定常流負荷に比し細胞間接着が弱かったことから、個々の細胞が独立して負荷応力に対応することで個々の細胞が負担する応力が大きくなり、ストレスファイバの形成が強いと考えられる。一方、定常流負荷では細胞間接着が維持されていたことから、個々の細胞が連携して負荷応力に対応することで個々の細胞が担う応力が小さくなり、ストレスファイバの形成が弱いと考えられる。しかし、それでは静水圧負荷の方が定常流負荷より一貫して伸展度合いが大きいはずであるが、応力負荷24時間後では伸展度合いが逆転した。培養血管内皮細胞に剪断応力を負荷した際、伸展およびストレスファイバの形成が顕著となるとともに、細胞のスティフネス (stiffness) が高くなることが報告されている[34]。このことから、静水圧負荷では、過度のストレスファイバ形成により、細胞が硬くなったり内皮下との接着が強固になったりした結果、伸展し難くなったのではないかと考えられる。

5.5.2 定常流と拍動流の違い

本章では、培養血管内皮細胞の細胞形態と配向性、細胞骨格、細胞間接着に対する定常流 (貫壁性圧力: 100 mmHg, 剪断応力: 1.5 Pa) と拍動流 (貫壁性圧力: 80/120 mmHg, 剪断応力: 1.2/1.8 Pa) の違いを検討した。その結果、拍動流の方が細胞の伸展度合いが大きかった。また、細胞の配向性も拍動流の方がより流れ方向と平行に配向した。剪断応力のみにおける定常流と拍動流における細胞伸展度合いを検討した報告では、定常流に比し拍動流の方が、伸展度合いが大きいことを示している[35],[36]。さらに Hsiai らは、剪断応力の勾配が大きいほど進展度合いが大きいことを報告している[36]。よって、拍動流は、定常流よりも細胞の伸展や配向を介したリモデリングを促進させると考えられ、血管傷害後の修復能や移植後の環境適応能で優位であると考えられる。

5.6 結言

本章では、静水圧負荷、定常流負荷、拍動流負荷による培養血管内皮細胞の細胞形態と配向性、細胞骨格、細胞間接着の違いを示し、前章で開発した拍動性灌流装置の有用性を示した。また、単独応力負荷よりも、複合応力負荷の方が、生体内に近い血管内皮細胞の状態を再現可能であることを示した。さらに、定常流よりも拍動流の方が血管内皮細胞のリモデリングを促進することを示した。次章では、糖尿病の血管内皮機能障害における血行力学的応力の影響を検討するため、本装置を用いて高血糖状態下の培養血管内皮細胞における遺伝子発現解析をした。

参考文献

- [1] Reidy, MA., and Langille, BL., The effect of local blood flow patterns on endothelial cell morphology, *Experimental and Molecular Pathology*, Vol.32, No.3 (1980), pp.276-289.
- [2] Langille, BL., and Adamson, SL., Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice, *Circulation Research*, Vol.48, No.4 (1981), pp.481-488.
- [3] Nerem, RM., Levesque, MJ., and Cornhill, JF., Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol.103, No.3 (1981), pp.172-176.
- [4] Flaherty, JT., Pierce, JE., Ferrans, VJ., Patel, DJ., Tucker, WK., Fry, DL., Endothelial nuclear patterns in the canine arterial tree with particular reference to hemodynamic events, *Circulation Research*, Vol.30, No. 1 (1972), pp.23-33.
- [5] Langille, BL., Reidy, MA., Kline, RL., Injury and repair of endothelium at sites of flow disturbances near abdominal aortic coarctations in rabbits, *Arteriosclerosis*, Vol.6, No.2 (1986), pp.146-154.
- [6] Krueger, JW., Young, DF., and Cholvin, NR., An in vitro study of flow response by cells, *Journal of biomechanics*, Vol.4, No.1 (1971), pp.31-36.
- [7] Dewey, CF., Jr., Bussolari, SR., Gimbrone, MA., Jr., Davies, PF., The dynamic response of vascular endothelial cells to fluid shear stress, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol.103, No.3 (1981), pp.177-185.

- [8] Remuzzi, A., Dewey, CF., Jr., Davies, PF., Gimbrone, MA., Jr., Orientation of endothelial cells in shear fields in vitro, *Biorheology*, Vol.21, No.4 (1984), pp.617-630.
- [9] Eskin, SG., Ives, CL., McIntire, LV., Navarro, LT., Response of cultured endothelial cells to steady flow, *Microvascular Research*, Vol.28, No.1 (1984), pp.87-94.
- [10] Levesque, MJ., Nerem, RM., The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol.107, No.4 (1985), pp.341-347.
- [11] Dartsch, PC., Betz, E., Response of cultured endothelial cells to mechanical stimulation, *Basic Research in Cardiology*, Vol.84, No.3 (1989), pp.268-281.
- [12] Deck JD., Endothelial cell orientation on aortic valve leaflets, *Cardiovascular Research*, Vol.20, No.10 (1986), pp.760-767.
- [13] Buck, RC., Contact guidance in the subendothelial space. Repair of rat aorta in vitro, *Experimental and Molecular Pathology*, Vol.31, No.2 (1979), pp.275-283.
- [14] Gotlieb, AI., Spector, W., Wong, MK., Lacey, C., In vitro reendothelialization. Microfilament bundle reorganization in migrating porcine endothelial cells, *Arteriosclerosis*, Vol.4, No.2 (1984), pp.91-96.
- [15] Gabbiani, G., Gabbiani, F., Lombardi, D., Schwartz, SM., Organization of actin cytoskeleton in normal and regenerating arterial endothelial cells, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.80, No.8 (1983), pp.2361-2364.
- [16] Kim, DW., Langille, BL., Wong, MK., Gotlieb, AI., Patterns of endothelial microfilament distribution in the rabbit aorta in situ, *Circulation Research*, Vol.64, No.1 (1989) pp.21-31.
- [17] Wong, AJ., Pollard, TD., Herman, IM., Actin filament stress fibers in vascular endothelial cells in vivo, *Science*, Vol.219, No.4586 (1983), pp.867-869.
- [18] White, GE., Fujiwara, K., Expression and intracellular distribution of stress fibers in aortic endothelium, *Journal of Cell Biology*, Vol.103, No.1 (1986), pp.63-70.
- [19] Masuda, H., Shozawa, T., Hosoda, S., Kanda, M., Kamiya, A., Cytoplasmic microfilaments in endothelial cells of flow loaded canine carotid arteries, *Heart and Vessels*, Vol.1, No.2 (1985), pp.65-69.

- [20] Dejana, E., Corada, M., Lampugnani, MG, Endothelial cell-to-cell junctions, *The FASEBJ Journal*, Vol.9, No.10 (1995), pp.910-918.
- [21] Lampugnani, MG, Dejana, E., Interendothelial junctions: structure, signalling and functional roles, *Current Opinion in Cell Biology*, Vol.9, No.5 (1997), pp.674-682.
- [22] Takeichi, M., Morphogenic roles of classical cadherins, *Current Opinion in Cell Biology*, Vol.7, No.5 (1995), pp.619-627.
- [23] Gumbiner, BM., Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis, *Cell*, Vol. 84, No.3 (1996), pp.345-357.
- [24] Lampugnani, MG, Resnati, M., Raiteri, M., Pigott, R., Pisacane, A., Houen, G., Ruco, LP., Dejana, E., A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts, *The Journal of Cell Biology*, Vol.18, No.6 (1992), pp.1511-1522.
- [25] Tanihara, H., Kido, M., Obata, S., Heimark, RL., Davidson, M., St., John, T., Suzuki, S., Characterization of cadherin-4 and cadherin-5 reveals new aspects of cadherins, *Journal of Cell Science*, Vol.107, No.6 (1994), pp.1697-1704.
- [26] Corada, M., Mariotti, M., Thurston, G., Smith, K., Kunkel, R., Brockhaus, M., Lampugnani, MG, Martin-Padura, I., Stoppacciaro, A., Ruco, L., McDonald, DM., Ward, PA., Dejana, E., Vascular endothelial-cadherin is an important determinant of microvascular integrity in vivo, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.96, No.17 (1999), pp. 9815-9820.
- [27] Dejana, E., Spagnuolo, R., Bazzoni, G., Interendothelial junctions and their role in the control of angiogenesis, vascular permeability and leukocyte transmigration, *Thrombosis and Haemostasis*, Vol.86, No.1 (2001), pp. 308-315.
- [28] Miao, H., Hu, YL., Shiu, YT., Yuan, S., Zhao, Y., Kaunas, R., Wang, Y., Jin, G., Usami, S., Chien, S., Effects of flow patterns on the localization and expression of VE-cadherin at vascular endothelial cell junctions: in vivo and in vitro investigations, *Journal of Vascular Research*, Vol.42, Nol.1 (2005), pp.77-89.
- [29] Sugaya, Y., Sakamoto, N., Ohashi, T., Sato, M., Elongation and Random Orientation of Bovine Endothelial Cells in Response to Hydrostatic Pressure: Comparison with Response to Shear Stress, *JSME International Journal Series C Mechanical Systems, Machine*

Elements and Manufacturing, Vol. 46, No.4 (2003), pp.1248-1255.

- [30] Ohashi T, Sugaya Y, Sakamoto N, Sato M., Hydrostatic pressure influences morphology and expression of VE-cadherin of vascular endothelial cells, *Journal of Biomechanics*, Vol.40, No.11 (2007), pp.2399-2405.
- [31] Girard, PR., Nerem, RM., Shear stress modulates endothelial cell morphology and F-actin organization through the regulation of focal adhesion-associated proteins, *Journal of Cellular Physiology*, Vol.163, No.1 (1995), pp.179-193.
- [32] Noria, S., Cowan, DB., Gotlieb, AI., Langille, BL., Transient and steady-state effects of shear stress on endothelial cell adherens junctions, *Circulation Research*, Vol.85, No.6 (1999), pp.504-514.
- [33] Kim, DW., Gotlieb, AI., Langille, BL., In vivo modulation of endothelial F-actin microfilaments by experimental alterations in shear stress, *Arteriosclerosis*, Vol.9, No.4 (1989), pp.439-445.
- [34] Sato, M., Levesque, MJ., Nerem, RM., Micropipette aspiration of cultured bovine aortic endothelial cells exposed to shear stress, *Arteriosclerosis*, Vol.7, No.3 (1987), pp.276-286.
- [35] Helmlinger, G, Geiger, RV., Schreck, S., Nerem, RM., Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology, *Journal of Biomechanical Engineering*, Vol.113, No.2 (1991), 123-131.
- [36] Hsiai, TK., Cho, SK., Honda, HM., Hama, S., Navab, M., Demer, LL., Ho, CM., Endothelial cell dynamics under pulsating flows: significance of high versus low shear stress slew rates ($d(\tau)/dt$), *Annals of Biomedical Engineering*, Vol.30, No.5 (2002), 646-656.

第6章 血管内皮遺伝子発現における血行力学的応力の影響

6.1 緒言

大血管障害である動脈硬化は、細小血管障害とは異なり、糖尿病に特異的なものではない。しかし、代表的な疫学研究である Framingham Heart Study によると、糖尿病患者における非糖尿病患者に対する新規冠動脈疾患の相対危険率は男性で 1.7 倍、女性で 3.8 倍、脳梗塞では男性で 1.7 倍、女性で 2.7 倍、末梢血管障害は男性で 4.0 倍、女性で 6.4 倍という結果であった[1]。このことは、糖尿病が大血管障害の発症危険性を増大させ、かつ冠動脈や脳動脈よりも末梢動脈の方が糖尿病の影響を受けやすいことを示唆している。動脈硬化はまず血管内皮細胞の障害を誘因として起こると考えられている。すなわち、高血圧、高 LDL コレステロール、高血糖、剪断応力などの影響により血管内皮細胞に障害が起こり、その後の種々の反応を引き起こすと考えられている[2]。培養血管内皮細胞を用いた検討において、酸化 LDL[3],[4]、高血糖[5]、剪断応力[6]によって血管内皮細胞膜上の単球に対する接着分子の発現量が変化することが報告されている。この接着分子の発現上昇は血管内皮細胞に対する単球の接着や遊走を引き起こす。

接着分子とは細胞表面に存在し、他の細胞と相互作用を行う際に細胞同士の粘着を助ける分子のことであり、細胞同士の粘着だけでなく、細胞と粘着することによって活性化させて粘着性を高める働きを有するものもある。接着分子は分子構造や支配遺伝子の類似性によってインテグリンファミリー、セレクトインファミリー、免疫グロブリンスーパーファミリー、CD44 ファミリー、カドヘリンファミリーなどに分類される。白血球の血管外への遊走は、白血球と血管内皮細胞に発現する複数の接着分子が関与しているが、これらの接着分子が一定の順序で働いており、回転、接着、遊走の3つの過程を経て起こると考えられている。第1段階である回転には、セレクトインファミリーに分類されるセレクトイン分子が関与する。セレクトイン分子には現在3種類の分子が存在し、E (endothelial) -セレクトインは主に血管内皮細胞に、P (platelet) -セレクトインは主に血小板と血管内皮細胞に、L (leukocyte) -セレクトインは白血球全般に発現する。最初、第1

段階では、血管内皮細胞に発現する E-, P-セレクトインと特異的に結合する分子（リガンド）との間、および白血球上の L-セレクトインと血管内皮細胞上のリガンドとの間に緩やかな結合が起こり、白血球は血管内皮細胞上を回転しながら移動する。次に、第2段階では、血管内皮細胞に発現し、免疫グロブリンスーパーファミリーに分類される ICAM-1 や VCAM-1 と白血球に発現するインテグリンとの結合による強固な接着が起こる。最後に、細3段階では、白血球は血管内皮細胞の間に浸潤し、血管外へと遊走する。この他に、MCP-1 は、単球走化性因子であるケモカイン（chemokine）に分類され、動脈硬化促進因子として注目されている。これらの接着分子やケモカインは、DNA 上の遺伝情報が mRNA にコピー（転写）され、さらに mRNA の情報を基にタンパク質が合成（翻訳）されることで機能を発揮する。

他方、血小板と血管内皮細胞の相互作用はあまり報告がなく、その分子機序は十分に明らかにはされていない。しかし、第1章でも検討したとおり、糖尿病状態下では、血管内皮細胞が剥離しなくても血管内皮細胞上に血小板が粘着し、血栓を形成することは間違いのない事実である[7]。また、血小板が活性化させた培養血管内皮細胞上の ICAM-1 を介して接着するという報告もあり[8]、高血糖により誘導された血管内皮細胞上の接着分子は血栓形成や動脈硬化の発症・進展に重要となってくる。さらに、近年、白血球-血小板複合体と血管内皮細胞との相互作用が炎症反応などを惹起することも指摘され始めている。このような血栓形成や動脈硬化促進因子は、血行力学的応力によっても左右されることが知られているが、病態における血行力学的応力の影響はほとんど検討がなされていない。

そこで本章では、病態の血管内皮遺伝子における血行力学的応力の影響を検討するため、始めに基礎検討として、本装置を用いてヒト大動脈血管内皮細胞に生理的な貫壁性圧力と剪断応力を伴った拍動流を負荷し、経時的な ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 mRNA レベルを検討した。次に、ネットとして負荷した拍動流に含まれる貫壁性圧力、剪断応力、拍動という3つの要素において、どの要素がどれだけ優位に作用するのかを検討するため、第5章で扱った静水圧負荷、定常流負荷、拍動流負荷における ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 mRNA レベルを検討した。最後に病態モデルとして、生理的な範囲外の貫壁性圧力が遺伝子発現にどう影響するかを検討するための高圧負荷モデルと、高血糖と生理的な拍動流の同時負荷が遺伝子発現にどう影響する

かを検討するための高血糖モデルの2つを検討した。

6.2 血行力学的応力と遺伝子発現

6.2.1 剪断応力に対する遺伝子発現変化

剪断応力は、血管拡張・収縮因子、接着因子、凝固因子、増殖因子など様々な因子を誘導する。内皮細胞に大動脈レベルの剪断応力を負荷した場合、血管拡張因子である内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) mRNA レベルは上昇し、一酸化窒素 (NO) の産生を促進する[9],[10]が、血管収縮因子のエンドセリン-1 (ET-1) mRNA レベルは減少する[11],[12]。しかし、大動脈レベルより低レベルの剪断応力を負荷した場合の ET-1 mRNA レベルは増加することから、剪断応力が高い場合は eNOS を産生し、ET-1 を抑制することで血管を拡張する方向に促し、逆に低い場合は eNOS を抑制し、ET-1 を産生することで血管の恒常性を保つと考えられる。剪断応力に対する ICAM-1 発現量は上昇するが、そのまま上昇を維持するという報告[6],[13]と、24 時間後に元のレベルに戻るといふ報告[14]がなされている。いずれの報告も流れを負荷後、数時間で ICAM-1 発現が上昇することから、虚血再灌流のような血流の急な上昇による炎症反応に重要な役割を果たしていると考えられる。VCAM-1 は、剪断応力の負荷時間に依存して、発現が減少することが報告されている[15],[16]。E-セレクトインの遺伝子発現は剪断応力によっては変化しないという報告[6],[14]がなされている一方で、剪断応力負荷により発現が増加し、負荷後 8 時間で最大となるという報告[17]もある。また MCP-1 mRNA レベルも剪断応力負荷により上昇することから[18]、ICAM-1 と同様の役割が考えられる。

6.2.2 伸展張力および貫壁性圧力に対する遺伝子発現変化

伸展張力や貫壁性圧力においても血管内皮細胞の遺伝子発現は誘導される。血管拡張因子である eNOS[19]や血管収縮因子である ET-1[20]は、伸展張力の負荷時間や大きさに依存して mRNA レベルが増加する。同様に、単球走化性因子である MCP-1[21],[22]や細胞接着分子である ICAM-1[23],[24]、E-セレクトイン[24]は伸展張力の負荷時間や大き

さに依存して mRNA レベルが増加するが、同じ接着分子である VCAM-1 は、伸展張力の影響は受けず、伸展張力負荷によって mRNA レベルは変化しない[24]。一方、貫壁性圧力が血管内皮細胞の遺伝子発現に及ぼす影響はほとんど報告がない。Riou らは、摘出したマウス頸動脈に 80 mmHg と 150 mmHg の管腔内圧を 24 時間負荷した結果、80 mmHg に比し、150 mmHg において VCAM-1 と MCP-1 の mRNA レベルが有意に増加したが、ICAM-1 と E-セレクトインは mRNA レベルの増加が認められなかった[25]。ただしこの結果には、管腔内圧による貫壁性圧力と伸展張力の影響が含まれていることを考慮する必要がある。

6.3 リアルタイム RT-PCR 法

リアルタイム RT-PCR 法は、高い定量性と再現性から、現在、遺伝子発現定量における標準的な方法として認知されている。従来、遺伝子発現定量に用いられてきたノーザンブロッティングと比較した際にリアルタイム RT-PCR 法の最大の利点はその速さと定量性にある。まずノーザンブロッティングで実験を行う場合には、一日以上を必要とし、それに対しリアルタイム RT-PCR 法は僅か 2 時間でデータを得ることができる。また、リアルタイム RT-PCR 法は一度に処理できるサンプル数がノーザンブロッティングに比べはるかに多い。次に、ノーザンブロッティングは電気泳動によるゲルのイメージングを数値化するため、遺伝子発現の変動が小さい場合は定量性に欠ける部分がある。以上のような理由から、本章ではリアルタイム RT-PCR 法を用いて遺伝子発現解析を行った。

6.3.1 リアルタイム RT-PCR 法の原理

PCR 法は、特定の DNA 領域を短時間で何万倍にも増幅させる方法である。まず、鋳型となる 2 本鎖の DNA を加熱して変性させ、1 本鎖にする。次に、増幅させたい領域の両端に相補的な 2 種類のプライマーと呼ばれる 20 塩基程度の短い DNA を用意し、プライマーと DNA の材料となるヌクレオチドと DNA ポリメラーゼを一緒に加えた状態で温度を下げることにより、プライマーが増幅させたい領域の相補的な配列を見つけ結合し、DNA ポリメラーゼ（合成酵素）がプライマーの続きを合成していく。この

ように、1 サイクルの PCR で鋳型 DNA が 2 倍に増えるとする、リアルタイム PCR 法は、増幅された DNA が一定量に達するまでに、PCR を何サイクル行ったかを初期 DNA 量の指標とする方法である。そして、PCR 法は微量な DNA の存在を鋭敏に検出できる方法であるのに対し、微量な mRNA の発現を検出する方法として RT-PCR 法がある。上述した PCR 法の原理における DNA ポリメラーゼは RNA を鋳型として DNA を合成することはできない。従って、RT-PCR 法では予め逆転写酵素を用いて RNA を鋳型とした相補的な DNA (cDNA) を合成し、合成した cDNA を鋳型として PCR 法を行う。

6.3.2 比較定量法

本実験では、mRNAの発現の評価方法として比較定量法を用いた。比較定量法は、「増幅産物がある量に達するのにPCRを何サイクル行ったかが分かれば初期量がわかる」という理論に基づいており、検量線の作成が不要である。PCRの増幅効率が1であれば、PCR反応1サイクルの差は初期量が2倍あることを意味する。つまり比較定量法では、定量結果は $2^{(\text{サイクル数の差})}$ 倍という式で求められる。比較定量法は基準となるサンプル(キャリブレーター)と比較して未知サンプルが何サイクル早く、あるいは何サイクル遅く一定量(Threshold line)に到達するか(threshold cycle: Ct)に注目して相対定量する。比較定量法が成立する条件として、1) ターゲット遺伝子と内在性コントロール遺伝子のPCR効率がほぼ等しい、つまり、検量線を描いた時の傾きが同じであること、2) PCR効率が1に近いこと、が挙げられる。ここで、内在性コントロール遺伝子とは、異なる組織間や発生の様々な過程、あるいは特定の実験処理によって発現量が変動しないような遺伝子のことである。本実験では β -GUSを用いた。キャリブレーターサンプルには、刺激前サンプルや0時間サンプルなど相対量の基準にしたいサンプルを1つ設定する。よって本実験ではmRNAの発現レベルを相対定量値 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ で評価した。ここで $\Delta Ct = \text{ターゲット遺伝子Ct} - \text{内在性コントロールCt}$ 、 $\Delta\Delta Ct = \text{各サンプル}\Delta Ct - \text{キャリブレーターサンプル}\Delta Ct$ で表される。相対定量値が1よりも大きければ発現が増加したことを示し、1よりも小さければ発現が減少したことを示す。

6.4 試料と実験方法

6.4.1 実験プロトコール

実験 1：拍動流負荷実験

本装置を用いてヒト大動脈血管内皮細胞 (HAEC) に拍動流 (貫壁性圧力: 80/120 mmHg, 剪断応力: 1.2/1.8 Pa) を 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間負荷した。応力負荷後の ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトリン, MCP-1 の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。

実験 2：単独応力負荷および複合応力負荷実験

遺伝子発現に対する貫壁性圧力の単独応力負荷と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷の違いを検討するため, 本装置を用いて HAEC に, 1) 静水圧 (貫壁性圧力: 100 mmHg, 剪断応力: 0.1 Pa 以下), 2) 定常流 (貫壁性圧力: 100 mmHg, 剪断応力: 1.5 Pa) を 12 時間負荷した。応力負荷後の ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトリン, MCP-1 の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。

実験 3：高圧力負荷実験

拍動流下の遺伝子発現に対する貫壁性圧力の大きさの違いを検討するため, 本装置を用いて HAEC に高圧力拍動流 (貫壁性圧力: 180/220 mmHg, 剪断応力: 1.2/1.8 Pa) を 6 時間負荷した。高圧力負荷における本装置のパラメータ R_c , R_p , C は, $R_c = 9 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $R_p = 18 \text{ mmHg}\cdot\text{min}/\text{cm}^3$, $C = 2503 \text{ m}^3/\text{mmHg}$ とした。応力負荷後の ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトリン, MCP-1 の mRNA 発現レベルをリアルタイム RT-PCR 法を用いて解析した。

実験 4：高血糖負荷実験

拍動流下の遺伝子発現に対する D-グルコース濃度の違いを検討するため, 本装置を用いて HAEC に拍動流 (貫壁性圧力: 80/120 mmHg, 剪断応力: 1.2/1.8 Pa) を 6 時間負荷した。灌流溶液には, 高血糖培地 (培地 + D-glucose 24.5 mmol/l) または高浸透圧培地 (培地 + L-glucose 24.5 mmol/l) を用いた。培地には 5.5 mmol/l の D-glucose が含まれ

ている。対照として、高血糖培地または高浸透圧培地で6時間静置培養した。応力負荷または静置培養後のICAM-1, VCAM-1, E-セレクトリン, MCP-1のmRNA発現レベルをリアルタイムRT-PCR法を用いて解析した。

6.4.2 測定および解析

応力負荷後のHAECから、RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen)を用いてRNAを抽出した。応力負荷後、灌流装置から取り外した培養ディッシュに新鮮な培地を加え、流路部分以外の細胞をセルスクレイパーで剥離した。その後細胞を培地で3回洗浄し、浮遊している細胞塊を取り除いた。洗浄後350 μ lのBuffer RLTを培養ディッシュに添加し、溶解物(lysate:ライセート)をRNaseフリーの1.5 mlマイクロチューブに入れた。Buffer RLTには予め10 μ l/mlの2-MEを加えた。ライセートはRNaseフリーのシリンジに取り付けた20Gの注射針中を10回通し、細胞を均質化した(homogenize:ホモジナイズ)。RNA精製のため、ホモジナイズしたライセートと同容量の70%エタノールを添加しピペティングで混合した。最大で700 μ lのサンプルを付属のスピンカラム(RNeasy mini spin column)に移し変え、10,000 rpmで15 s遠心操作した。コレクションチューブ(2 ml collection tube)に溜まった廃液を捨て、再度スピンカラムに取り付けた。洗浄のため、700 μ lのBuffer RW1をスピンカラムに添加し、10,000 rpmで15 s遠心操作した。コレクションチューブを廃棄し、付属の新しいコレクションチューブをスピンカラムに装着した。洗浄のため、スピンカラムにBuffer RPE 500 μ lを添加し、10,000 rpmで15 s遠心操作した。コレクションチューブに溜まった廃液を捨て、再度スピンカラムに取り付けた。シリカゲルメンブレンの乾燥のため、再度スピンカラムにBuffer RPE 500 μ lを添加し、10,000 rpmで2 min遠心操作した。RNA溶出のため、スピンカラムを付属の新しいコレクションチューブ(1.5 ml collection tube)に移し、RNaseフリーの水17 μ lを直接シリカゲルメンブレンに添加し、10,000 rpmで1 min遠心操作した。抽出したRNAから、2 μ lのRNAをRNaseフリーの水で50倍に希釈し、分光光度計(Gene Quant, Amersham Biosciences)にてRNAの量を測った。測定には抽出RNA濃度が100 μ g/ml以上のサンプルのみを使用した。cDNA(complementary DNA)の作成には抽出したRNAとRNaseフリーの水との総量が14 μ lで終濃度が100 μ g/mlになるように混合し、ランダムプラ

イマー (Random Primer, TaKaRa) 1.25 μ l を加え, サーマルサイクラー (PC-708, アステック) にて 70 °C に 10 分間静置した. その後, ただちに 0 °C 5 分間静置した. この試料を逆転写するため, Buffer を 5.0 μ l, DTT を 2.5 μ l, dNTP Mix (2.5mmol/l dNTP Mix, invitrogen) を 0.625 μ l, RNase inhibitor (RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega) を 0.625 μ l, Reverse Transcriptase (SuperScript II Reverse Transcriptase, invitrogen) を 1.0 μ l 混合した溶液を試料の上に添加し, 室温で 15 分間静置した. 静置した試料をサーマルサイクラーにて 42 °C に 60 分間静置し, cDNA を作成した. 作成した cDNA は -20°C にて mRNA 測定時まで凍結保存した.

mRNA の測定には Master Mix 5 μ l (qPCR MasterMix Plus, 日本ジーン) に対し, β gas, ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 の各種プライマープローブ (TaqMan Gene Expression Assays GEx, Applied Biosystems) を 2 μ l 混合し, 96 well マイクロプレート (96-Well Fast Thermal Cycling Plate, Applied Biosystems) に添加した. プライマープローブを添加した 96 well マイクロプレートに RNase フリーの水により 30 倍に希釈した cDNA 3 μ l を添加し, 総量が 10 μ l になるようにした. リアルタイム RT-PCR (7900HT Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems) にて mRNA の測定を行った.

6.4.3 統計解析

実験データは全て平均±標準誤差で表した. また, 実験データは全て正常血糖培地を用いて静置培養した際の mRNA level を基準とし, Mann-Whitney *U* 検定[43]を用いて解析した.

6.5 結果

6.5.1 拍動流負荷における遺伝子発現の経時的変化

HAEC に拍動流 (貫壁性圧力 : 80/120 mmHg, 剪断応力 : 1.2/1.8 Pa) を 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間負荷した際の ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 の mRNA level の経時的変化を図 6.1-4 に示した. 各図の 0 時間には, 正常血糖培地を用いて静置培養した際の mRNA level をプロットした. 各図の縦軸は, 0 時間を 1 とした時の各時間にお

ける mRNA 発現レベルの相対比を表している。その結果、ICAM-1、E-セレクチン、MCP-1 とともに一過性の発現増加が認められた。ICAM-1 は拍動流負荷後、12 時間までは発現が増加し、その後減少、48 時間ではほぼ static control level まで戻った (図 6.1)。E-セレクチンは拍動流負荷後、12 時間までは発現が増加し、その後減少するが、48 時間経過しても static control level まで戻ることはなかった (図 6.3)。MCP-1 は拍動流負荷後、3 時間までは発現が増加し、その後減少、48 時間では static control level まで戻った (図 6.4)。一方、VCAM-1 は拍動流負荷後、負荷時間に依存して発現は単調減少した (図 6.2)。

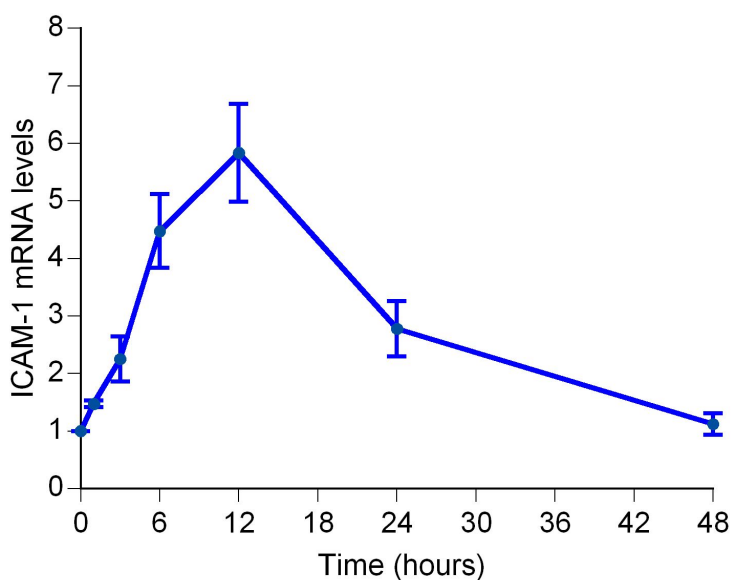


図 6.1 拍動流（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）負荷における ICAM-1 mRNA level の経時的変化

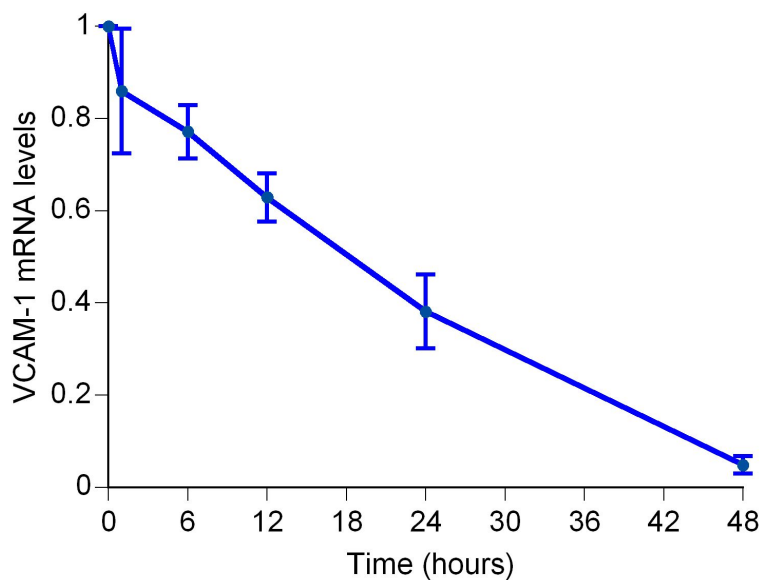


図 6.2 拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）

における VCAM-1 mRNA level の経時的変化

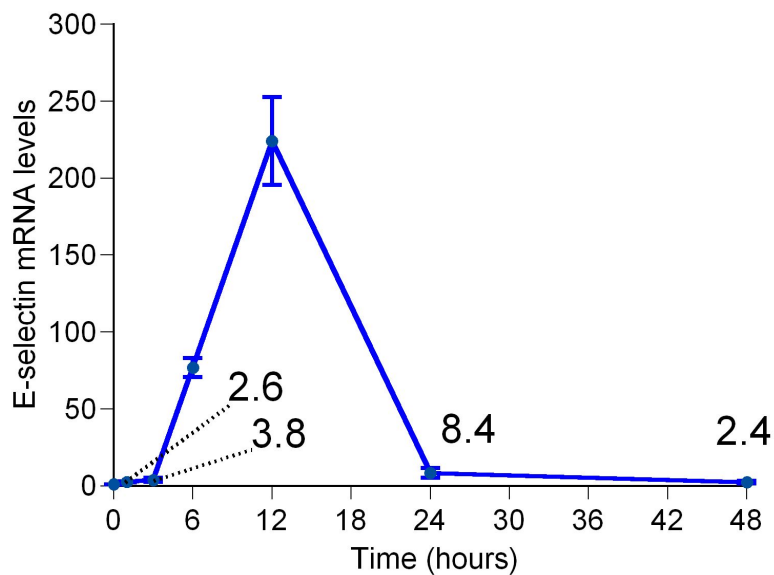


図 6.3 拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）

における E-セレクチン mRNA level の経時的変化

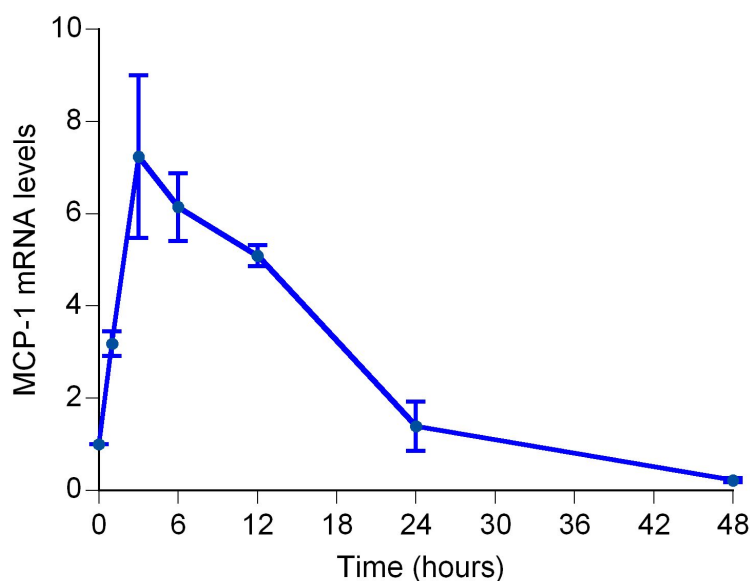


図 6.4 拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
における MCP-1 mRNA level の経時的変化

6.5.2 単独応力負荷と複合応力負荷による遺伝子発現の違い

次に，6.5.1 の結果で ICAM-1，E-セレクチン発現がピークであった拍動流負荷後 12 時間に関して，貫壁性圧力の単独応力と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力の違いがどう影響しているかを検討した．貫壁性圧力の単独応力（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：0.1 Pa 以下）と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）を 12 時間 HAEC に負荷した際の ICAM-1，VCAM-1，E-セレクチン，MCP-1 の mRNA level を図 6.5-8 に示した．各図の縦軸は，正常血糖培地を用いて静置培養した際の mRNA level を 1 とした時の各応力における mRNA 発現レベルの相対比を表している．その結果，ICAM-1 の mRNA level においては，貫壁性圧力の単独負荷よりも貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷の方が，発現が有意に増加していた（図 6.5）．しかし，VCAM-1 と E-セレクチンにおいては，単独応力負荷と複合応力負荷では有意な差は認められなかった（図 6.6，図 6.7）．また，MCP-1 においては，単独応力負荷よりも複合応力負荷の方が，発現が有意に減少していた（図 6.8）．

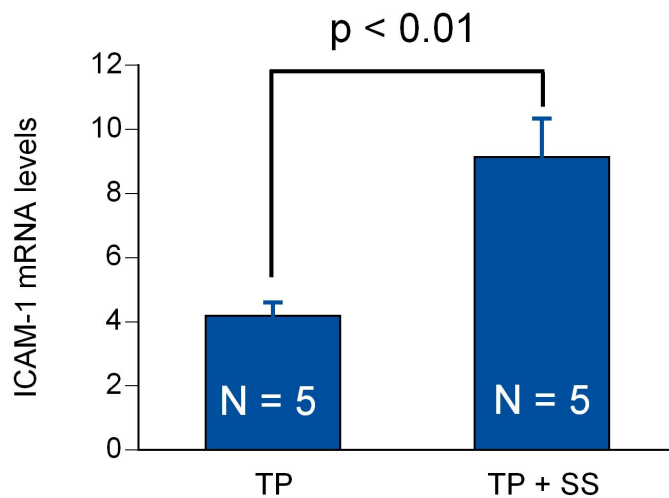


図 6.5 貫壁性圧力の単独応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：0.1 Pa 以下）と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）における ICAM-1 mRNA level

TP (transmural pressure) : 貫壁性圧力, SS (shear stress) : 剪断応力

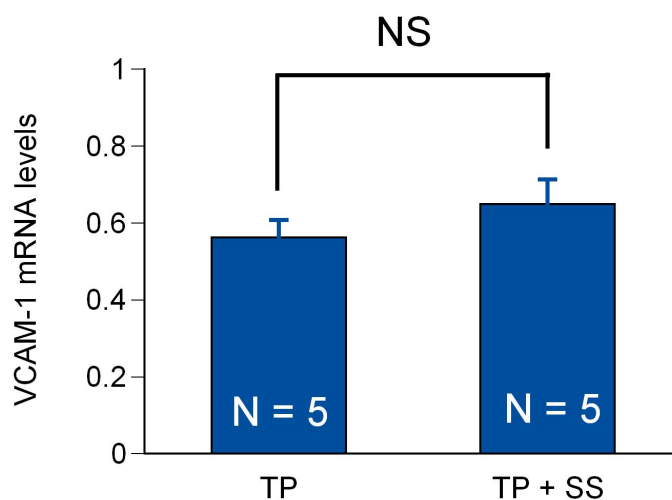


図 6.6 貫壁性圧力の単独応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：0.1 Pa 以下）と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）における VCAM-1 mRNA level

TP (transmural pressure) : 貫壁性圧力, SS (shear stress) : 剪断応力

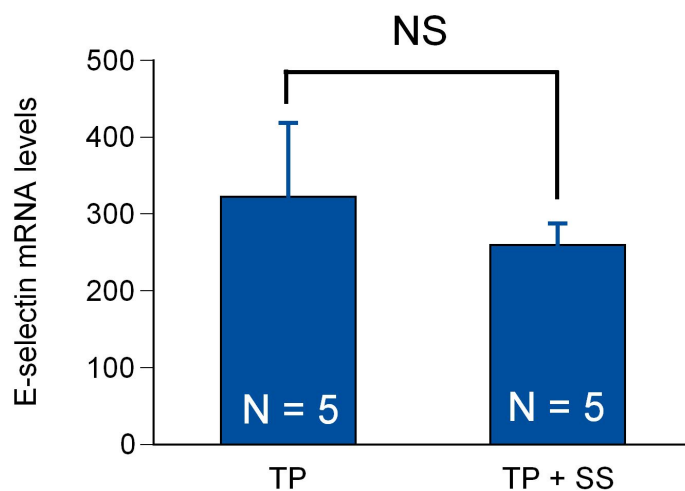


図 6.7 貫壁性圧力の単独応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：0.1 Pa 以下）と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）における E-セレクチン mRNA level

TP (transmural pressure) : 貫壁性圧力, SS (shear stress) : 剪断応力

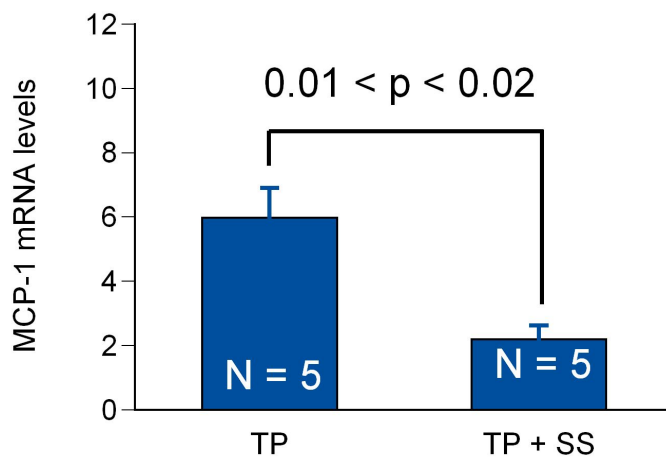


図 6.8 貫壁性圧力の単独応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：0.1 Pa 以下）と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）における MCP-1 mRNA level

TP (transmural pressure) : 貫壁性圧力, SS (shear stress) : 剪断応力

6.5.3 定常流負荷と拍動流負荷による遺伝子発現の違い

次に、6.5.1の結果で ICAM-1, E-セレクトイン発現がピークであった拍動流負荷後 12 時間に関して、貫壁性圧力と剪断応力の複合応力の定常流と拍動流の違いがどう影響しているかを検討した。定常流（貫壁性圧力：100 mmHg, 剪断応力：1.5 Pa）と拍動流（貫壁性圧力：80/120 mmHg, 剪断応力：1.2/1.8 Pa）を12時間HAECに負荷した際の ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 の mRNA level を図 6.9-12 に示した。ここで、定常流負荷の結果は 6.5.2 における貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷の結果と同一であり、拍動流負荷の結果は 6.5.1 の拍動流負荷 12 時間の結果と同一である。各図の縦軸は、正常血糖培地を用いて静置培養した際の mRNA level を 1 とした時の各応力における mRNA 発現レベルの相対比を表している。その結果、ICAM-1 においてのみ定常流負荷に比し、拍動流負荷において mRNA level が有意に抑制されていた（図 6.9）。一方、VCAM-1, E-セレクトインにおいては定常流負荷と拍動流負荷で mRNA level に有意な差は認められなかった（図 6.10, 6.11）。さらに、MCP-1 においては、定常流負荷に比し拍動流負荷において mRNA level が有意に増加していた。

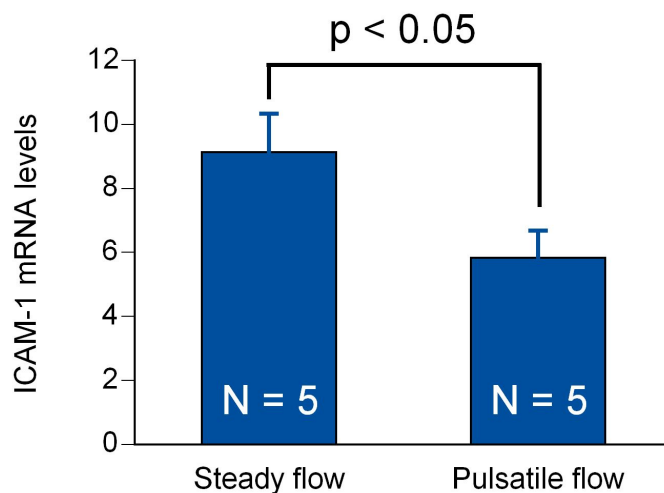


図 6.9 定常流負荷（貫壁性圧力：100 mmHg, 剪断応力：1.5 Pa）と拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg, 剪断応力：1.2/1.8 Pa）における ICAM-1 mRNA level

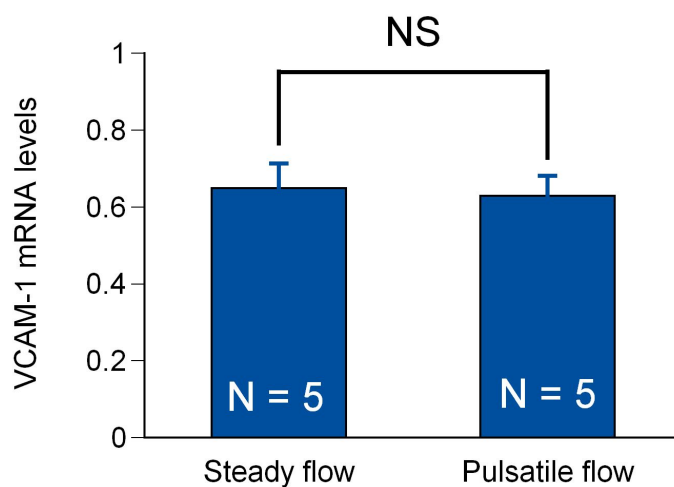


図 6.10 定常量負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）と拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）における VCAM-1 mRNA level

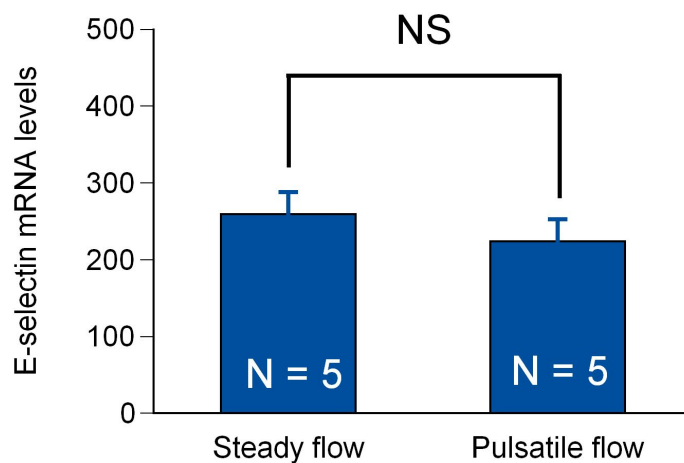


図 6.11 定常量負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）と拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）における E-セレクチン mRNA level

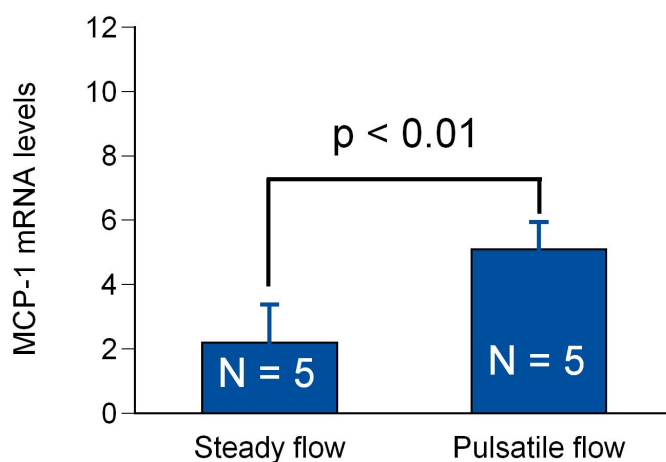


図 6.12 定常量負荷（貫壁性圧力：100 mmHg，剪断応力：1.5 Pa）
と拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
における MCP-1 mRNA level

6.5.4 正常圧力負荷と高圧力負荷による遺伝子発現の違い

次に、拍動流下の遺伝子発現において、貫壁性圧力の大きさがどう影響するかを検討した。拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）と高圧力拍動流負荷（貫壁性圧力：180/220 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）を6時間 HAEC に負荷した際の ICAM-1，VCAM-1，E-セレクチン，MCP-1 の mRNA level を図 6.13-16 に示した。ここで、正常圧力負荷の結果は 6.5.1 の拍動流負荷 6 時間の結果と同一である。各図の縦軸は、正常血糖培地を用いて静置培養した際の mRNA level を 1 とした時の各応力における mRNA 発現レベルの相対比を表している。その結果、全ての遺伝子において正常圧力負荷に比し、高圧力負荷で mRNA level が増加しており、さらに ICAM-1, VCAM-1 においては有意な差が認められた。（図 6.13-6.16）

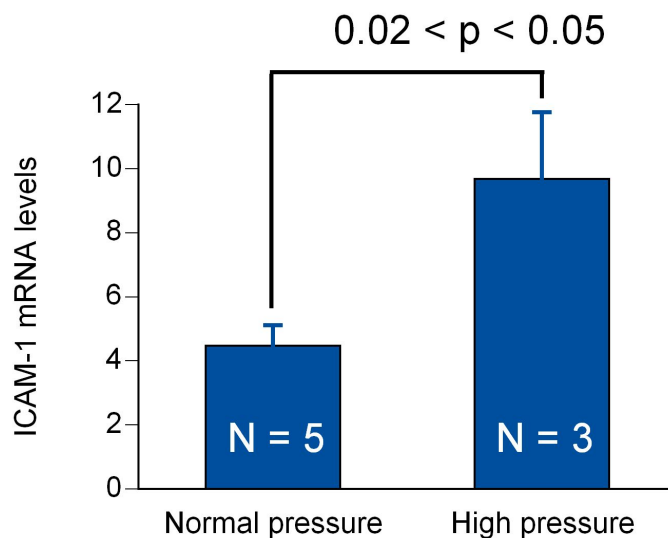


図 6.13 正常圧力負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
と高圧力負荷（貫壁性圧力：180/220 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
における ICAM-1 mRNA level

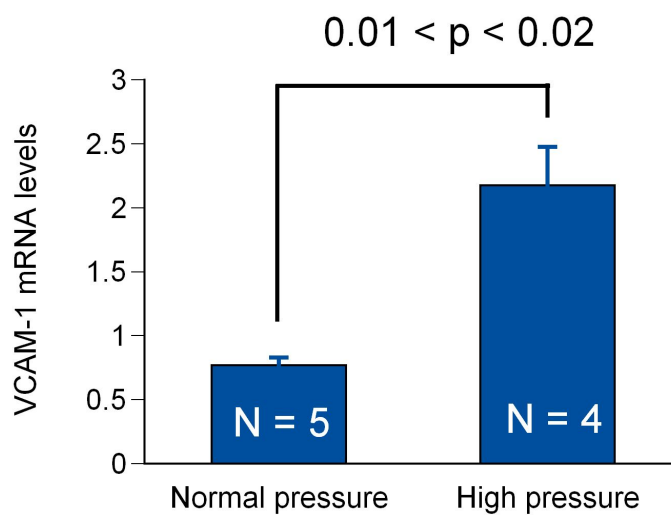


図 6.14 正常圧力負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
と高圧力負荷（貫壁性圧力：180/220 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
における VCAM-1 mRNA level

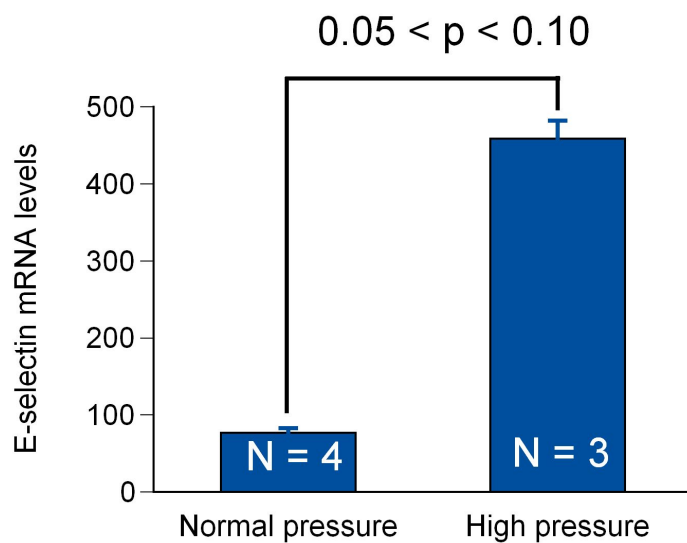


図 6.15 正常圧力負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
と高圧力負荷（貫壁性圧力：180/220 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
における E-セレクチン mRNA level

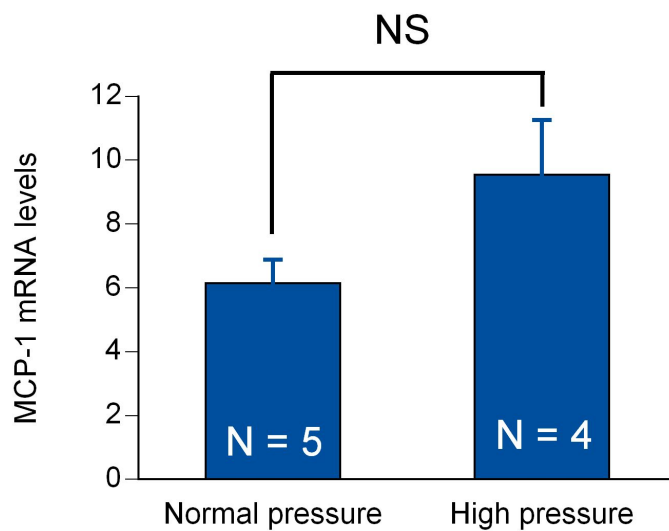


図 6.16 正常圧力負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
と高圧力負荷（貫壁性圧力：180/220 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）
における MCP-1 mRNA level

6.5.5 正常血糖負荷と高血糖負荷による遺伝子発現の違い

最後に、拍動流下の遺伝子発現において、D-グルコース濃度がどう影響するかを検討した。拍動流（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）負荷6時間後に関し、正常血糖培地（5.5 mmol/l）を灌流させた場合と高血糖培地（30 mmol/l）を灌流させた場合と高浸透圧負荷として正常血糖培地にL-glucoseを24.5 mmol/l加えたものを比較した。拍動流負荷の結果は6.5.1の拍動流負荷6時間の結果と同一である。各図の縦軸は、正常血糖培地を用いて静置培養した際のmRNA levelを1とした時の各応力におけるmRNA発現レベルの相対比を表している。各図の左から、高血糖培地で静置培養した結果、高浸透圧培地で静置培養した結果、正常血糖培地で拍動流負荷した結果、高血糖培地で拍動流負荷した結果、高浸透圧培地で拍動流負荷した結果である。その結果、静置培養下では正常血糖負荷に比し、高血糖負荷と高浸透圧負荷においてICAM-1のmRNA levelはわずかに増加したが、拍動流下では、高血糖培地において約9.2倍、高浸透圧負荷において正常血糖負荷と同レベルの約4.5倍に増加した（図6.17）。VCAM-1のmRNAレベルに関しては、静置培養下では正常血糖負荷に比し、高血糖負荷と高浸透圧負荷において多少増加した。また、拍動流下において正常血糖培地では減少するVCAM-1のmRNA level（約0.8倍）は、高血糖培地では約1.7倍に増加を認めた。また、拍動流下における高浸透圧負荷では、拍動流下における正常血糖培地と同様減少していた（図6.18）。E-セレクトインのmRNAレベルに関しては、静置培養下では、高血糖負荷で約5.7倍、高浸透圧負荷で約4倍に増加した。しかし、拍動流下においては、正常血糖負荷では約77倍であったのに対し、高血糖負荷で約460倍、高浸透圧負荷で190倍に増加した（図6.17）。MCP-1のmRNAレベルに関しては、静置培養下では、高血糖負荷および高浸透圧負荷ともにわずかに増加が認められた。また拍動流下のMCP-1 mRNAレベルにおいては、正常血糖負荷では約6倍であったのに対し、高血糖負荷で約8.3倍、高浸透圧負荷で約7.7倍とともに増加した（図6.20）。

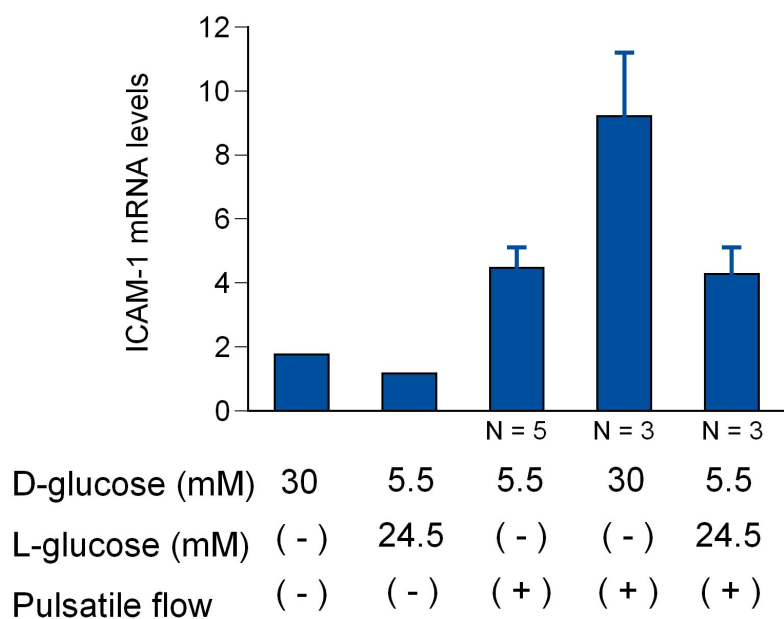


図 6.17 拍動流下における ICAM-1 mRNA level に対する高血糖の影響

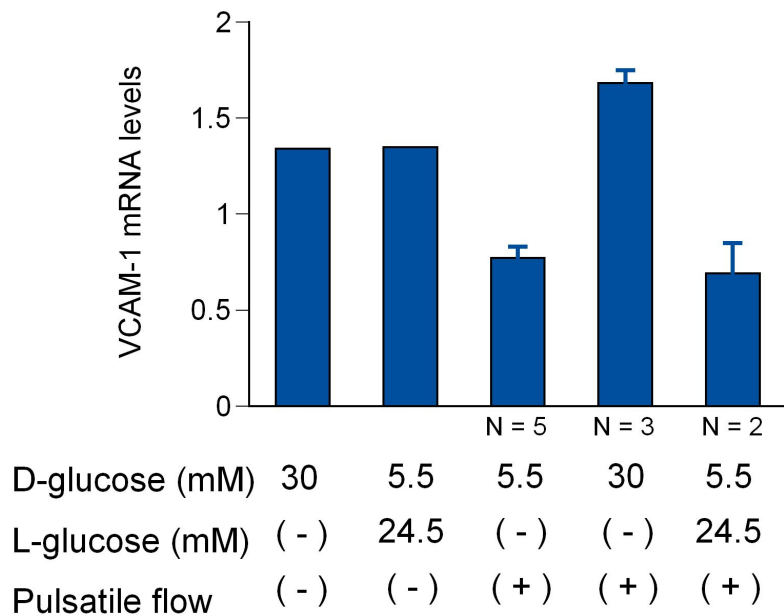


図 6.18 拍動流下における VCAM-1 mRNA level に対する高血糖の影響

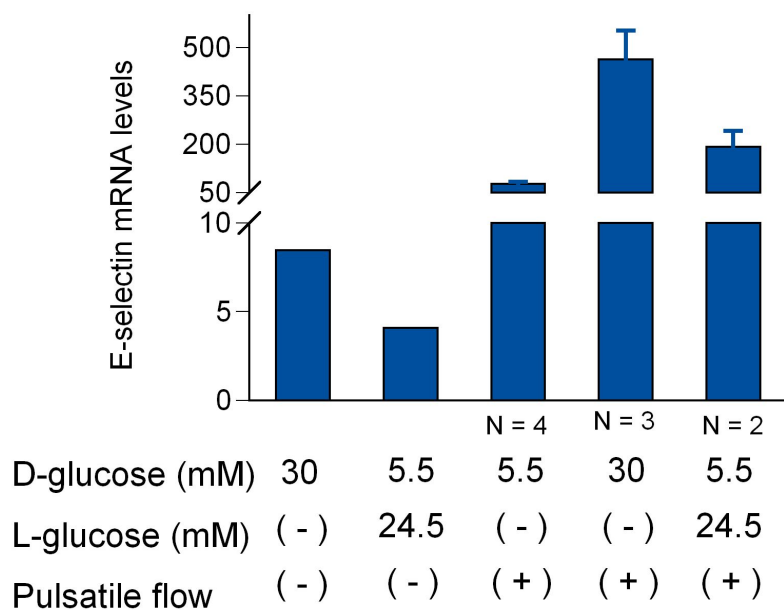


図 6.19 拍動流下における E-セレクトイン mRNA level に対する高血糖の影響

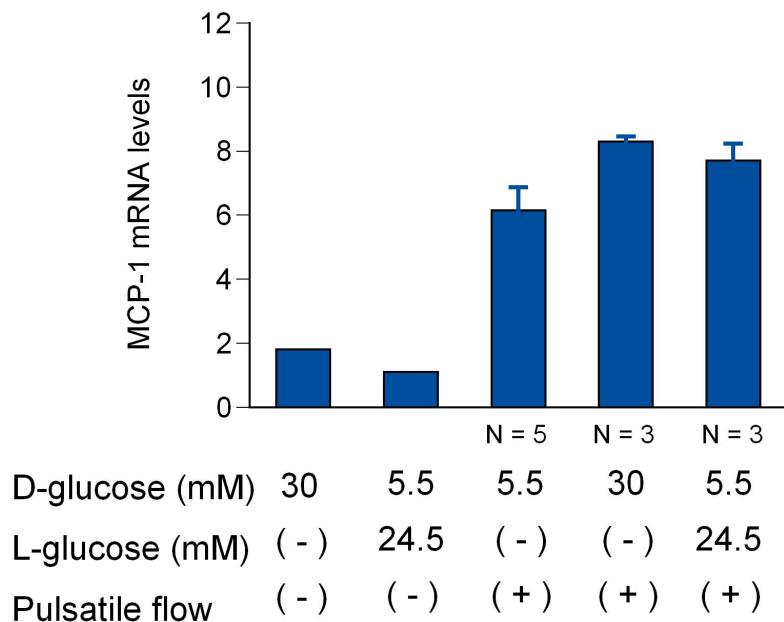


図 6.20 拍動流下における MCP-1 mRNA level に対する高血糖の影響

6.6 考察

6.6.1 拍動流負荷と剪断応力負荷における遺伝子発現との違い

本章ではまず，HAEC に拍動流（貫壁性圧力：80/120 mmHg，剪断応力：1.2/1.8 Pa）を 1, 3, 6, 12, 24, 48 時間負荷した際の ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 の mRNA level の経時的変化を検討した。その結果，ICAM-1 mRNA 発現レベルに関して，本実験では拍動流負荷後 12 時間まで増加しその後減少，48 時間ではほぼ静置培養レベルまで戻った。剪断応力負荷における ICAM-1 発現の経時的変化は，6-8 時間辺りで最大となり，24 時間後では発現が持続するという報告[6],[12]と静置培養レベルまで戻るとい報告[14]とがある。VCAM-1 mRNA 発現レベルに関して，本実験では拍動流負荷後時間依存的に減少した。この結果は，剪断応力負荷における VCAM-1 発現の経時的変化と同じであった[14]-[16]。E-セレクトイン mRNA 発現レベルに関して，本実験では拍動流負荷後 12 時間まで増加しその後減少したが，48 時間後においても静置培養レベルと比し発現が増加していた。剪断応力負荷における E-セレクトイン発現は変化しないという報告[6],[14]がなされている一方で，剪断応力負荷により発現が増加し，負荷後 8 時間で最大となるという報告[17]もある。MCP-1 mRNA 発現レベルに関して，本実験では拍動流負荷における MCP-1 発現の経時的変化は，3 時間まで増加しその後減少，48 時間では完全に静置培養レベルまで戻った。剪断応力負荷における MCP-1 発現は 1.5 時間で最大となり 4 時間には静置培養レベルまで戻る[18]。

これら本実験結果と先行研究の違いは貫壁性圧力もしくは拍動の影響と思われる。よって，次に，貫壁性圧力の単独応力（静水圧）と貫壁性圧力と剪断応力の複合応力（定常流），さらに，複合応力の拍動性（拍動流）がこれら遺伝子発現にどう影響を及ぼすかを検討した。

6.6.2 静水圧，定常流，拍動流負荷における遺伝子発現の違い

まず，貫壁性圧力の単独応力（静水圧）負荷が遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。

その結果、静水圧負荷（貫壁性圧力：100 mmHg, 剪断応力：0.1 Pa 以下）では、静置培養に比し、ICAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 の mRNA level は増加し、VCAM-1 の mRNA level は減少した。この結果は、伸展張力負荷による mRNA レベルの変化と同一の結果 [21]-[24], となったが、本実験では負荷時間を 12 時間にのみ設定したため、より長時間負荷した際に貫壁性圧力と伸展張力の mRNA レベルに違いが生じるかは分からない。次に、貫壁性圧力と剪断応力の複合応力（定常流）が遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。その結果、定常流負荷（貫壁性圧力：100 mmHg, 剪断応力：1.5 Pa）では、静水圧負荷に比し、ICAM-1 では mRNA level は増加したが、VCAM-1, E-セレクトインでは変化せず、MCP-1 では減少した。ICAM-1 は、剪断応力負荷で mRNA level が増加する [6],[12],[14], ので、定常流負荷では、静水圧負荷による発現増加に剪断応力負荷による発現増加が加わったと考えられる。一方、VCAM-1, E-セレクトインに関しては、剪断応力負荷では mRNA level が減少 [15],[16] もしくは変化しない [6],[14] ので、定常流負荷では、静水圧負荷による発現増加と同等な発現が維持されていると考えられる。また、MCP-1 に関しては、剪断応力負荷では 12 時間後には静置培養レベルにまで戻っている [18], つまり発現が抑制されているので、定常流負荷では、静水圧負荷による発現増加に剪断応力負荷による発現抑制が加わり、結果的に発現が静水圧負荷に比し減少していると考えられる。

最後に、複合応力の拍動性が遺伝子発現に及ぼす影響を検討した。その結果、拍動流負荷（貫壁性圧力：80/120 mmHg, 剪断応力：1.2/1.8 Pa）では、定常流負荷に比し、ICAM-1 においてのみ mRNA level の減少が認められた。一方、VCAM-1 と E-セレクトインでは mRNA level に変化は認められず、MCP-1 では、mRNA level が増加した。本実験で負荷した拍動流は、貫壁性圧力の拍動の影響と剪断応力の拍動の影響が含まれている。本実験結果からでは貫壁性圧力と剪断応力のどちらの拍動が mRNA level の変化に関与しているかは断定できない。しかし、ステップ応答やインパルス応答といった一過性の剪断応力によって MCP-1 は、mRNA level が増加すること [28] が報告されている。また、ICAM-1 の転写因子である NF- κ B は、定常圧では活性化されるが、拍動圧では活性化されないことが報告されている。よって今後は、負荷応力の違いによる転写因子の活性まで検討する必要がある。

これらの結果は、培養細胞を用いて貫壁性圧力、貫壁性圧力と剪断応力の複合応力、

また複合応力の勾配が遺伝子発現を修飾することを証明した初めての結果である。

6.6.3 高圧負荷における遺伝子発現の増加

高血圧は心血管疾患の最大の危険因子であり、長期にわたる高血圧は多岐の合併症をもたらす。約 2000 人を対象にした Takagi らの調査において、血圧が高いほど心血管疾患死亡者数が増加したという報告がなされている[30]。また、40 万人を対象にしたメタアナリシス (APCSC) では収縮期血圧値が高いほど心血管疾患死亡危険性は上昇するという結果が得られた[31]。脳梗塞は脳の動脈硬化病変に血栓が生じ、閉塞する場合(血栓性)と心臓などからの遊離血栓による脳動脈の閉塞 (塞栓性) がある。脳梗塞および脳出血の最大の危険因子は高血圧であり、40 歳以上の全町民を対象とした疫学研究である久山町研究では、血圧値と脳梗塞発症を約 30 年間追跡した結果、高血圧患者は正常血圧者に比して有意に上昇した[32],[33]。このように、虚血性疾患の最大の危険因子は高血圧である。その機序として、動脈壁に対する血流増加が、内皮由来の NO や PGI₂ などの産生低下、ET-1 などの増殖因子や VCAM-1 などの接着分子の発現を介して動脈硬化の発症や進展に関与することが多くの基礎実験を通して明らかにされつつある。しかし高血圧では、血流増加のみならず血圧も上昇しているが[34],[35]、どのような機序で動脈硬化を発症や進展に関与しているかは明らかにされていない。そこで本章では、生理的な血行力学的応力が血管内皮細胞に負荷されている状態 (貫壁性圧力: 80/120 mmHg, 剪断応力: 1.2/1.8 Pa) と、血圧だけが生理的な範囲外で負荷されている状態 (貫壁性圧力: 180/220 mmHg, 剪断応力: 1.2/1.8 Pa) とを比較することで、生体内における血圧上昇の意義を検討した。その結果、ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 の全ての遺伝子において正常圧力負荷に比し、高圧力負荷で mRNA レベルが増加していた。この結果は、貫壁性圧力が遺伝子発現に影響を及ぼすだけでなく、貫壁性圧力の大きさも血管内皮細胞の遺伝子発現に影響を及ぼすことを示している。Riou らは、摘出したマウス頸動脈に 80 mmHg と 150 mmHg の管腔内圧を 24 時間負荷した結果、80 mmHg に比し、150 mmHg において VCAM-1 と MCP-1 の mRNA レベルが有意に増加したが、ICAM-1 と E-セレクトインは mRNA レベルの増加が認められなかった[25]。また、本実験条件において 24 時間応力を負荷した結果、ICAM-1 の mRNA レベルが高圧力負荷で有意

に増加していたがVCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 では正常圧力に比しmRNAレベルの変化は認められなかった (データ未掲載). 本実験条件とRiouらの実験条件の違いは, 伸展張力の有無もあるが, 最も異なる点は生理的な剪断応力が負荷されているかどうかである. 本実験結果において高圧力負荷 6 時間後では増加していたmRNAレベルが, 24 時間後には正常圧力と同一レベルまで戻ったことを考慮すると, 生理的な剪断応力が高圧力によって増加した遺伝子発現を抑制したとも考えられる. このような議論からも分かるように, 複合的な応力負荷は単独の応力負荷が及ぼす影響とは異なる細胞応答を示す可能性が考えられる.

6.6.4 高血糖負荷における遺伝子発現の増加

高血糖負荷において ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 発現は増加することが報告されている[36]-[39]. また, ICAM-1 の場合, 12 時間以降に増加するといった報告[40]や, 6 時間かつ 16,7mmol/l でピークに達するといった報告[41]もある. Kado らは, HAEC を 30 mmol/l D-glucose で 0, 6, 12, 24, 48 時間刺激し, ICAM-1 mRNA レベルを定量 RT-PCR で測定・解析した結果, 5.5 mmol/l D-glucose に比し, 12 時間以降で有意な増加を認めた. また, 5.5 mmol/l D-glucose + 24.5 mmol/l L-glucose or mannitol 24.5 mmol/l で 24 時間インキュベーションした結果, D-glucose (約 3.7 倍) と同様, L-glucose (約 2 倍) と mannitol (2.6 倍) 負荷においても増加が認められた. この結果は, D-glucose の ICAM-1 mRNA 発現への影響は, D-glucose 特有であるが, 部分的には容量オスモル濃度にも起因することを示している. 本章では, 高血糖 (D-glucose 30 mmol/l) および高浸透圧 (D-glucose 5.5 mmol/l + L-glucose 24.5 mmol/l) 負荷 6 時間に関して, 静置培養下と拍動流下で比較した. その結果, 先行研究同様, 静置培養下では高血糖および高浸透圧負荷において ICAM-1 mRNA レベルはほとんど変化しなかったが, 拍動流下では高血糖負荷において ICAM-1 mRNA レベルが約 9.2 倍に増加した. また, 拍動流下における高浸透圧負荷では, 正常血糖 (D-glucose 5.5 mmol/l) 負荷とほぼ同じ発現レベル (約 4.5 倍) であったことから, 拍動流下の高血糖負荷における ICAM-1 mRNA レベルの増加は高血糖に起因することを示している. Piga らは, HAEC を 25 mmol/l D-glucose で 1-4 時間刺激し, VCAM-1 と MCP-1 mRNA レベルをリアルタイム RT-PCR で測定・解析した結果, 5.5 mmol/l D-glucose

に比し、3時間以降で VCAM-1 は約 3 倍、MCP-1 は約 2.5 倍の有意な増加を認めた[42]。しかし、タンパク質レベルにおいては、VCAM-1 は高血糖負荷 4 時間後に最大となり（約 4 倍）12 時間後には正常血糖負荷と同様の発現レベルにまで戻った。また、MCP-1 のタンパク質レベルは、高血糖負荷 4 時間後に最大となり（約 4 倍）12 時間後まで発現レベルは変わらなかった。本章では、高血糖（D-glucose 30 mmol/l）および高浸透圧（D-glucose 5.5 mmol/l + L-glucose 24.5 mmol/l）負荷 6 時間に関して、先行研究のように VCAM-1 と MCP-1 mRNA レベルに有意な増加は認められなかった。しかし、拍動流下において正常血糖負荷では減少する VCAM-1 mRNA レベル（約 0.8 倍）は、高血糖培地では増加（約 1.7 倍）を認めた。また、拍動流下における高浸透圧負荷では正常血糖負荷と同様の発現レベル（約 0.7 倍）であったことから、拍動流下の高血糖負荷における VCAM-1 mRNA レベルの増加は高血糖に起因することを示している。同様に、拍動流下の MCP-1 mRNA レベルは、高血糖負荷において約 8.3 倍に増加した。しかし、正常血糖負荷では約 6 倍、高浸透圧負荷では 7.7 倍であったことから、拍動流下の高血糖負荷における MCP-1 mRNA レベルの増加は、D-glucose 特有というよりも、容量オスモル濃度に起因するところが大きいことを示している。よって、MCP-1 mRNA の発現は、高血糖の影響よりも、拍動流や浸透圧など、力学的刺激の影響を受けやすいことが考えられる。

6.7 結言

本章では、血管内皮細胞における ICAM-1, VCAM-1, E-セレクトイン, MCP-1 の mRNA レベルが貫壁性圧力負荷、貫壁性圧力と剪断応力の複合応力負荷、複合応力負荷の拍動性によって修飾されることが示された。また、拍動流負荷において、貫壁性圧力のみを病的なレベルに上昇させた場合、これらの遺伝子発現は、より発現が促進されることを示した。最後に、貫壁性圧力と剪断応力を伴った生理的な拍動流負荷と高血糖負荷との相互作用によって遺伝子発現がより促進されることを示した。以上の結果から、遺伝子発現の調節機構には、剪断応力のみならず貫壁性圧力も重要な役割を果たすとともに、応力の複合や応力の勾配によっても影響を及ぼすことが示された。また、高血圧や高血糖などを特徴とする病態における遺伝子発現の調節機構に、血行力学的応力が重要な影響を及ぼすことが示された。

参考文献

- [1] Kannel WB, McGee DL. Diabetes and cardiovascular diseases: the Framingham study. *JAMA*. Vol.241, No.19 (1979), pp.2035-2038.
- [2] Ross R., The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s, *Nature*. Vol. 362, No. 6423 (1993), pp.801-809.
- [3] Kume, N., Cybulsky, MI., Gimbrone, MA. Jr., Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.90, N. 3 (1992), pp.1138-1144.
- [4] Kume, N., Gimbrone, MA. Jr., Lysophosphatidylcholine transcriptionally induces growth factor gene expression in cultured human endothelial cells, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.93, No.2 (1994), pp.907-911.
- [5] Kado, S., Wakatsuki, T., Yamamoto, M., Nagata, N., Expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by high glucose concentrations in human aortic endothelial cells, *Life sciences*, Vol.68, No.7 (2001), pp.727-737.
- [6] Nagel, T., Resnick, N., Atkinson, WJ., Dewey, CF. Jr., Gimbrone, MA. Jr., Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.94, No.2 (1994), pp.885-891.
- [7] Manduteanu, I., Calb, M., Lupu, C., Simionescu, N., Simionescu, M., Increased adhesion of human diabetic platelets to cultured valvular endothelial cells. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology*, Vol.24, No.4 (1992), pp.539-547.
- [8] Li, JM., Podolsky, RS., Rohrer, MJ., Cutler, BS., Massie, MT., Barnard, MR., Michelson, AD., Adhesion of activated platelets to venous endothelial cells is mediated via GPIIb/IIIa, *Journal of Surgical Research*, Vol.61, No.2 (1996), pp.543-548.
- [9] Nishida, K., Harrison, DG., Harrison, DG., Navas, JP., Fisher, AA., Dockery, SP., Uematsu, M., Nerem, RM., Alexander, RW., Murphy, TJ., Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase, *The Journal of Clinical*

- Investigation*, Vol.90, No.5 (1992), pp.2092-2096.
- [10] Gan, LM., Selin-Sjogren, L., Doroudi, R., Jern, S., Temporal regulation of endothelial ET-1 and eNOS expression in intact human conduit vessels exposed to different intraluminal pressure levels at physiological shear stress, *Cardiovascular Research*, Vol.48, No.1 (2000), pp.168-177.
- [11] Sharefkin, JB., Diamond, SL., Eskin, SG., McIntire, LV., Dieffenbach, CW., Fluid flow decreases preproendothelin mRNA levels and suppresses endothelin-1 peptide release in cultured human endothelial cells, *Journal of Vascular Surgery*, Vol.14, No.1 (1991), pp. 1-9.
- [12] Malek, A., Izumo, S., Physiological fluid shear stress causes downregulation of endothelin-1 mRNA in bovine aortic endothelium, *American journal of physiology. Cell physiology*, Vol.263, No.2 Pt 1 (1992), pp.C389-96.
- [13] Tsuboi, H., Ando, J., Korenaga, R., Takada, Y., Kamiya, A., Flow stimulates ICAM-1 expression time and shear stress dependently in cultured human endothelial cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.206, No.3 (1995), pp.988-996.
- [14] Sampath, R., Kukielka, GL., Smith, CW., Eskin, SG., McIntire, LV., Shear stress-mediated changes in the expression of leukocyte adhesion receptors on human umbilical vein endothelial cells in vitro, *Annals of Biomedical Engineering*, Vol.23, No.3 (1995) pp.247-256.
- [15] Ando, J., Tsuboi, H., Korenaga, R., Takada, Y., Toyama-Sorimachi, N., Miyasaka, M., Kamiya, A., Shear stress inhibits adhesion of cultured mouse endothelial cells to lymphocytes by downregulating VCAM-1 expression. *American Journal of Physiology. Cell physiology*, Vol.267, No.3 Pt 1 (1994), pp.C679-C687.
- [16] Ohtsuka, A., Ando, J., Korenaga, R., Kamiya, A., Toyama-Sorimachi, N., Miyasaka, M., The effect of flow on the expression of vascular adhesion molecule-1 by cultured mouse endothelial cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.193, No.1 (1993), pp. 303-310.
- [17] Ando, J., Tsuboi, H., Korenaga, R., Kosaki, K., Isshiki, M., Takada, Y., Kamiya, A., Fluid

- shear stress differentially modulates adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells, *Organ microcirculation: Bridging between Basic and Clinical Sciences*, (1997), pp.61-68, Excerpta Medica Tokyo.
- [18] Shyy, YJ., Hsieh, HJ., Usami, S., Chien, S., Fluid shear stress induces a biphasic response of human monocyte chemotactic protein 1 gene expression in vascular endothelium, *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol.91, No.11 (1994), pp.4678-4682.
- [19] Awolesi, MA., Sessa, WC., Sumpio, BE., Cyclic strain upregulates nitric oxide synthase in cultured bovine aortic endothelial cells, *The Journal of Clinical Investigation*, Vol.96, No.3 (1995), pp.1449-1454.
- [20] Wang, DL., Wung, BS., Peng, YC., Wang, JJ., Mechanical strain increases endothelin-1 gene expression via protein kinase C pathway in human endothelial cells, *Journal of Cellular Physiology*, Vol.163, No.2 (1995), pp.400-406.
- [21] Wang, DL., Wung, BS., Shyy, YJ., Lin, CF., Chao, YJ., Usami, S., Chien, S., Mechanical strain induces monocyte chemotactic protein-1 gene expression in endothelial cells. Effects of mechanical strain on monocyte adhesion to endothelial cells, *Circulation Research*, Vol.77, No.2 (1995), pp.294-302.
- [22] Wung, BS., Cheng, JJ., Chao, YJ., Lin, J., Shyy, YJ., Wang, DL., Cyclical strain increases monocyte chemotactic protein-1 secretion in human endothelial cells, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Vol.270, No.4 (1996), pp.H1462- H1468.
- [23] Cheng, JJ., Wung, BS., Chao, YJ., Wang, DL., Cyclic strain enhances adhesion of monocytes to endothelial cells by increasing intercellular adhesion molecule-1 expression, *Hypertension*, Vol.28, No.3 (1996), pp.386-391.
- [24] Yun, JK., Anderson, JM., Ziats, NP., Cyclic-strain-induced endothelial cell expression of adhesion molecules and their roles in monocyte-endothelial interaction, *The Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.44, No.1 (1999), pp.87-97.
- [25] Riou, S., Mees, B., Esposito, B., Merval, R., Vilar, J., Stengel, D., Ninio, E., van, Haperen, R., de, Crom, R., Tedgui, A., Lehoux, S., High pressure promotes monocyte adhesion to the vascular wall, *Circulation Research*, Vol.100, No.8 (2007), pp.1226-1233.

- [26] Hishikawa, K., Nakaki, T., Suzuki, H., Saruta, T., Kato, R., Transmural pressure inhibits nitric oxide release from human endothelial cells, *European Journal of Pharmacology*, Vol.215, No.2-3 (1992), pp.329-331.
- [27] Hishikawa, K., Nakaki, T., Marumo, T., Suzuki, H., Kato, R., Saruta, T., Pressure enhances endothelin-1 release from cultured human endothelial cells, *Hypertension*, Vol.25, No.3 (1995), pp.449-452.
- [28] Bao, X., Lu, C., Frangos, JA., Temporal gradient in shear but not steady shear stress induces PDGF-A and MCP-1 expression in endothelial cells: role of NO, NF kappa B, and egr-1, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, Vol.19, No.4 (1999), pp.996-1003..
- [29] Lehoux, S., Esposito, B., Merval, R., Tedgui, A., Differential regulation of vascular focal adhesion kinase by steady stretch and pulsatility, *Circulation*, Vol.111, No.5 (2005), pp.643-649.
- [30] Takagi, S., Saitoh, S., Nakano, M., Hayashi, Y., Obara, F., Onishi, H., Shimamoto, K., Relationship between blood pressure level and mortality rate: an 18-year study conducted in two rural communities in Japan, *Journal of hypertension*, Vol.18, No.2 (2000), pp.139-144.
- [31] Lawes, CM., Rodgers, A., Bennett, DA., Parag, V., Suh, I., Ueshima, H., MacMahon, S., Asia Pacific Cohort Studies Collaboration. Blood pressure and cardiovascular disease in the Asia Pacific region, *Journal of hypertension*, Vol.21, No.3 (2003), pp.707-716.
- [32] Omae, T., Ueda, K., Kikumura, T., *et al.* Cardiovascular deaths among hypertensive subjects of middle to old age: a long-term follow-up study in a Japanese community. In: Onesti G, Kim KE, eds. *Hypertension in the Young and Old*. New York, (1981), NY: Grune & Stratton; pp.285-297.
- [33] Katsuki, S., Hiroya, Y., Akazonme, T., Takeya, S., Omae, T., Takano, S., Epidemiological Studies On Cerebrovascular Disease in Hisayama, Kyushu Island, Japan. I. With Particular reference to cardiovascular status, *Japanese heart journal*, (1964), Vol.127, pp.12-36.
- [34] Harper, SL., and Bohlen, HG., Microvascular adaptation in the cerebral cortex of adult spontaneously hypertensive rats, *Hypertension*, Vol.6, No.3 (1984), pp.408-419.

- [35] Meininger, GA., Fehr, KL., Yates, MB., Borders, JL., and Granger, JH., Hemodynamic characteristics of the intestinal microcirculation in renal hypertension, *Hypertension*, Vol.8, No.1 (1986), pp.66-75.
- [36] Esposito, C., Fasoli, G., Plati, AR., Bellotti, N., Conte, MM., Cornacchia, F., Foschi, A., Mazzullo, T., Semeraro, L., Dal, Canton, A., Long-term exposure to high glucose up-regulates VCAM-induced endothelial cell adhesiveness to PBMC, *Kidney International*, Vol.59, No.5 (2001), pp.1842-1849.
- [37] Manduteanu, I., Voinea, M., Antohe, F., Dragomir, E., Capraru, M., Radulescu, L., Simionescu, M., Effect of enoxaparin on high glucose-induced activation of endothelial cells, *European Journal of Pharmacology*, Vol.477, No.3 (2003), pp.269-276.
- [38] Piconi, L., Quagliari, L., Da., Ros, R., Assaloni, R., Giugliano, D., Esposito, K., Szabó, C., Ceriello, A., Intermittent high glucose enhances ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and interleukin-6 expression in human umbilical endothelial cells in culture: the role of poly(ADP-ribose) polymerase, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, Vol.2, No.8 (2004), pp.1453-1459.
- [39] Takaishi, H., Taniguchi, T., Takahashi, A., Ishikawa, Y., Yokoyama, M., High glucose accelerates MCP-1 production via p38 MAPK in vascular endothelial cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Vol.305, No.1 (2003), pp.122-128.
- [40] Kado, S., Wakatsuki, T., Yamamoto, M., Nagata, N., Expression of intercellular adhesion molecule-1 induced by high glucose concentrations in human aortic endothelial cells, *Life Science*, Vol.68, No.7 (2001), pp.727-737.
- [41] Takami, S., Yamashita, S., Kihara, S., Kameda-Takemura, K., Matsuzawa, Y., High concentration of glucose induces the expression of intercellular adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells, *Atherosclerosis*, Vol.138, No.1 (1998), pp.35-41.
- [42] Piga, R., Naito, Y., Kokura, S., Handa, O., Yoshikawa, T., Short-term high glucose exposure induces monocyte-endothelial cells adhesion and transmigration by increasing VCAM-1 and MCP-1 expression in human aortic endothelial cells, *Atherosclerosis*, Vol.193, No.2(2007), pp.328-334.
- [43] 縣俊彦, *基本医学統計学EBM・医学研究への応用*, (1999), 89-90 頁, 中外医学社.

第7章 結論

本研究では、糖尿病における血栓形成性の検討、培養血管内皮細胞用拍動性灌流装置の開発、糖尿病状態下の血管内皮遺伝子発現における血行力学的応力の影響、の3つをメインテーマとした。第2章では、光化学反応刺激による血栓モデルを用いて糖尿病モデル動物における血栓形成性の亢進を示した。また、本モデルで形成される血栓が血小板と血管内皮細胞から構成されていたことより、糖尿病における血栓形成性の亢進には血小板と血管内皮細胞の機能異常が重要因子であることを示した。第3章では、糖尿病の血栓形成性亢進における重要因子の一つである血小板に着目し、光散乱粒子計測法を用いて糖尿病患者における血小板凝集能の亢進を示した。然るに、糖尿病の血栓形成性亢進におけるもう一つの重要因子である血管内皮細胞に着目し検討を進めていく上で、生体内において血管内皮細胞が曝されている血流と血圧という血行力学的応力は、最大限考慮されるべき要件である。そこで第4章では、培養血管内皮細胞に生体内血管レベルの血流と圧力を同時負荷かつ独立制御可能な拍動性灌流装置を開発した。第5章では、開発した同装置を用いて、血流や血圧のみといった単独応力負荷よりも、両者が関与する複合応力負荷の方が、生体内に近い血管内皮細胞状態を再現可能であることを示した。第6章では、糖尿病の血管内皮細胞における血栓形成関連遺伝子発現には、高血糖のみならず、血流や血圧がそれらの遺伝子発現を促進させることを示した。従来、動脈硬化部位の血流停滞や高血圧などが、細胞接着分子やケモカインの遺伝子発現を促進することは知られていたが、血管に常時暴露されている生理的な血流や血圧が、他の遺伝子発現要因(本実験では高血糖)とどのような相互作用を示すのかは未知であった。従って、本研究で明らかにした血管内皮遺伝子発現に対する高血糖刺激と血流や血圧刺激の相互作用は、糖尿病における血栓性合併症発症機序の解明の一助となる。以下に、本研究の結果と現在までの知見を踏まえ、糖尿病における血栓性合併症の発症機序をまとめた。

糖尿病における高血糖状態は、細胞接着分子の ICAM-1, VCAM-1, E-セレクチンやケモカインの MCP-1 などの遺伝子を発現させるが、血管内皮細胞に常時暴露されている血流や血圧はそれらの遺伝子発現をさらに促進させる。従って糖尿病状態下の血管内皮細胞では、初期の頃から既に、血球との相互作用をし易い環境が整っていると考える

れる。一方、循環血液中の血小板は活性化準備段階にあり、血流や血圧の軽微な変化や他の血球や血管内皮細胞との物理的な接触に対して活性化し易い状態にある。活性化された血小板は血管内皮細胞と相互作用をし、血管内皮細胞上への粘着や凝集が誘導される。そして、血小板の凝集塊は、一部は塞栓として、一部はそのまま凝集が亢進し血小板血栓となる。また、循環血液中の単球は、ICAM-1、VCAM-1、E-セレクトリンなどの細胞接着分子の発現により血管内皮細胞表面に接着し易くなり、また単球走化因子である MCP-1 の産生により内膜下へ浸潤・遊走し易くなる。その結果、血管壁への脂質沈着やプラーク形成を経て粥状動脈硬化を誘発する。このように塞栓、血小板血栓といった血栓形成性の亢進並びに粥状動脈硬化の誘発因子の発現は、最終的には血栓性合併症の発症に繋がる。

最後に、本研究に関連した展望を述べる。本研究では、糖尿病における血管内皮遺伝子発現には高血糖という化学的刺激のみならず血流や血圧といった力学的刺激が生体内では重要であることを示したが、生体の血管部位に対応した力学的刺激の大きさや刺激を負荷する細胞種、伸展張力を考慮した力学的刺激といったパラメータの詳細な検討は今後必要である。また、本研究の発展として、糖尿病における血管内皮遺伝子発現に対する薬剤の発現抑制効果や、糖尿病における血管内皮細胞への血球接着やそれに対する薬剤の接着阻害効果の検討が挙げられる。これらの検討は本研究で開発した拍動性灌流装置を用いることで、より生体内に近い結果が得られると推測できる。そしてこれらの研究から得られた知見は、動脈硬化症や高血圧症などのような組織の力学的特性や力学的環境の変化を伴う病態の発症機序の解明にも不可欠である。さらには疾患の予防、治療法の開発にも繋がり、組織再生工学や人工臓器の開発などにも重要な情報を提供する。本装置は血管のバイオメカニクスにおける有用なツールとなり、血管機能の解明のみならず、病態発症や進展機序の解明に寄与することが期待できる。

謝辞

本研究は2005年の4月より慶應義塾大学理工学部物理情報工学科南谷研究室において行われました。本研究を遂行するにあたり、適切なお指導やお助言、充実した研究環境を与えて頂きました南谷晴之教授に心より感謝致します。また、本論文をまとめるにあたり、専門領域からのお指導やお助言を賜りました本塾理工学部システムデザイン工学科の谷下一夫教授、同学部物理情報工学科の荒井恒憲教授、内山孝憲准教授に心より感謝致します。

主な研究の場であった国立病院機構埼玉病院臨床研究部において、臨床の立場からのお指導やお助言、充実した研究環境を与えて頂きました関塚永一副院長をはじめ、医療法人亮友会大塩医院の大塩力院長、自治医科大学脳神経外科教室の石川眞実病院助教、国立病院機構埼玉病院の脳神経外科の山口則之医長に心より感謝致します。また、本研究の遺伝子発現解析において、実験のお指導から結果の考察まで、快く専門知識をご教授して頂きました防衛医科大学第二内科の三浦総一郎教授、穂苅量太准教授に心より感謝致します。

南谷研究室所属の方々には公私ともにお世話になりました。同研究室の訪問研究員である平原修三氏には、流体力学や画像解析について数多くの知識をご教授して頂きました。また、共に本研究のテーマに取り組んだ広瀬耕徳君、内田祥太君、小俣麻里子さん、友廣淳平君、北里大学医療衛生学部医療工学科の高沢天湖さんに感謝致します。

最後に、博士課程に在籍中、惜しめない協力と愛情で支えてくれた家族に心より感謝いたします。

2008年2月

中楯 浩康

著者文献

【主論文に関する公刊論文】

Nakadate H, Shimizu T, Uchida T, Sekizuka E, Minamitani H, Ishikawa M, Oshio C, Accelerated thrombus formation in diabetic microcirculation, *Microvascular Reviews and Communications* (E journal accepted).

Nakadate H, Hirose Y, Sekizuka E, Minamitani H, A New *in Vitro* Pulsatile Perfusion System that Mimics Physiological Transmural Pressure and Shear Stress in Any Size of *in Vivo* Vessel, *Journal of Biomechanical Science and Engineering*, Vol.3, No.1, 2008 (E journal accepted).

中楯浩康, 関塚永一, 南谷晴之, 糖尿病患者におけるレーザ散乱粒子計測法を用いた血小板凝集能測定の有用性, *電気学会論文誌C*, 第127巻, 第10号, 1515-1521頁, 2007.

【その他公刊論文】

南谷晴之, 太田裕貴, 中楯浩康, 小俵麻里子, 関塚永一, 大塩力, 光化学反応刺激による内皮細胞と血小板および白血球接着に対するイブジラストの作用の検討, *血栓止血誌*, 第19巻, 第1号, 2008 (印刷中).

関塚永一, 細田泰雄, 玉井恒憲, 大塩力, 穂苅量太, 石井裕正, 中楯浩康, 宮崎耕司, 田邊利郎, 三浦総一郎, 日比紀文, 末松誠, わが国の絶食療法の現況と消化管粘膜の遺伝子学的検討. *消化器科*, 第45巻, 第1号, 1-7頁 2007.

Ishikawa M, Sekizuka E, Yamaguchi N, Nakadate H, Terao S, Granger DN, Minamitani H. Angiotensin II type 1 receptor signaling contributes to platelet-leukocyte-endothelial cell interactions in the cerebral microvasculature, *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, Vol.292, No.5, pp.H2306-H2315, 2007.

中楯浩康, 内田祥太, 石川眞実, 山口則之, 大塩力, 南谷晴之, 関塚永一, マルチカラーイメージングを用いた血液流動性測定における新しい観察法, *日本ヘモレオロジー学会誌*, 第9巻, 第2号, 11-14頁, 2006.

Hirose Y, Sekizuka E, Nakadate H, Ozawa T, Minamitani H, Oshio C, Ishii H. Role of oxidative stress in interaction between endothelial cells and platelets in diabetes. *Organ Microcirculation - A Gateway to Diagnostic and Therapeutic Interventions* -, pp.239-241, ed. by H.Ishii, M.Suematsu, K.Tanishita, H.Suzuki, Springer-Verlag, 2005.

【その他論文】

中楯浩康, 関塚永一, 太田裕貴, 南谷晴之, レーザ散乱粒子計測法を用いた糖尿病患者における血小板凝集能亢進の定量化, *生体・生理工学シンポジウム論文集*, 第21巻, 195-196頁, 2006.

Nakadate H, Sekizuka E, Oshio C, Hirose Y, Gokan H, Minamitani H, The effect of shear stress on the accelerated adhesion of diabetic platelets, *Microcirculation annual*, Vol.20, pp.51-52, 2004.

Nakadate H, Sekizuka E, Oshio C, Tsukada K, Uchida T, Ozawa T, Minamitani H, Fundamental study of a particle counting method using laser-light scattering in detection of platelet aggregates under diabetes mellitus, *Microcirculation annual*, Vol.18, pp129-130, 2002.

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, 散乱光を用いた血小板凝集能測定装置の基礎特性と糖尿病血小板凝集能亢進の検討, *電気学会医用・生体工学研究会資料*, 第MBE-02巻, 59-71号, 53-56頁, 2002.

【学会発表, 国外】

H Nakadate, E Sekizuka, C Oshio, H Minamitani. Effect of antithrombotic agents aspirin, beraprost sodium and heparin on thrombus formation in mesenteric microcirculation of streptozotocin-induced diabetic rats. *24th European Conference on Microcirculation*, 2006-9 (Amsterdam).

【学会発表. 国内】

中楯浩康, 小俵麻里子, 友廣淳平, 南谷晴之, 内皮細胞の接着分子発現におけるイメージング解析, 第16回日本バイオイメージング学会学術集会, 2007-11 (野田).

中楯浩康, 関塚永一, 穂苅量太, 南谷晴之, 生理的圧力を伴った拍動流が培養血管内皮細胞の遺伝子発現におよぼす影響, 第30回日本血栓止血学会学術集会, 2007-11 (志摩).

中楯浩康, 南谷晴之, 石川眞実, 山口則之, 大塩力, 関塚永一. 糖尿病微小循環の易血栓形成性における糖尿病性血管内皮機能障害の優位性. 第50回日本糖尿病学会年次集会, 2007-5 (仙台).

Nakadate H, Uchida S, Sekizuka E, Ryota Hokari, Minamitani H, Influence of pulsatile pressure in hypertension on the gene expression in cultured aortic endothelial cells *The 32nd Annual Meeting of Japanese Society for Microcirculation*, 2007-2 (Kyoto).

中楯浩康, 内田祥太, 南谷晴之, 関塚永一, 拍動流下における血球と血管内皮細胞との相互作用の観察, 第13回日本ヘモレオロジー学会, 2006-11 (名古屋).

中楯浩康, 関塚永一, 太田裕貴, 南谷晴之, レーザ散乱粒子計測法を用いた糖尿病患者における血小板凝集能亢進の定量化, 第21回生体・生理工学シンポジウム, 2006-11 (鹿児島).

中楯浩康, 関塚永一, 内田祥太, 小俵麻里子, 太田裕貴, 南谷晴之, 圧力・流量同時制御型拍動性灌流装置の開発とその応用, 第29回日本血栓止血学会学術集会, 2006-11 (宇都宮).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 南谷晴之, 圧力およびせん断応力を同時制御可能なPulsatile Flow Systemの開発, 第12回日本ヘモレオロジー学会, 2005-11 (京都).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 広瀬耕徳, 後閑治彦, 南谷晴之, 糖尿病易血栓性におけるシェアストレスの影響, 第29回日本微小循環学会総会, 2004-2, (熊本).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 広瀬耕徳, 後閑治彦, 南谷晴之, 糖尿病状態下におけるAGEと活性酸素の血小板粘着への影響, 第10回日本ヘモレオロジー学会, 2003-11 (神戸).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, レーザ散乱粒子計測に基づく糖尿病血小板凝集能の測定, 第42回日本エム・イー学会大会, 2003-6 (札幌).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, 森下鉄夫, 糖尿病状態下における血管内皮細胞と血小板との相互作用の検討, 第28回日本微小循環学会総会, 2003-2 (東京).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, レーザー散乱粒子計測型血小板凝集能測定装置を用いた糖尿病における血小板障害メカニズムの検討, 第9回日本ヘモレオロジー学会, 2002-11 (和光).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, 散乱光を用いた血小板凝集能測定装置の基礎特性と糖尿病血小板凝集能亢進の検討, 電気学会医用・生体工学研究会, 2002-11 (東京).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 小澤正, 広瀬耕徳, 南谷晴之, 糖尿病におけるLSPAを用いた血小板凝集能の評価, 第25回日本血栓止血学会学術集会, 2002-11 (神戸).

中楯浩康, 関塚永一, 大塩力, 塚田孝祐, 内田朋宏, 小澤正, 南谷晴之, 糖尿病血小板凝集能測定におけるレーザー散乱光粒子計測法の基礎的検討, 第27回日本微小循環学会総会, 2002-2 (東京).

その他、共同演者にて 33 件発表.