

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年6月15日現在

機関番号：35302

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21500418

研究課題名（和文） 組織培養による生体軟組織の力学的適応現象の解明

研究課題名（英文） Tissue culture studies on the mechanical adaptation of biological soft tissues

研究代表者

林 紘三郎 (HAYASHI KOZABURO)

岡山理科大学・工学部・教授

研究者番号：90026196

研究成果の概要（和文）： 力学的負荷に対する生体軟組織の応答を綿密に調べるために、腱・靭帯と血管それぞれを長期間培養できる装置を開発した。これらを用いることによって、生体軟組織の適応と再構築の現象を *in vitro* で詳細に観察し、そのメカニズムを明らかにする研究が可能になった。また、ポリフェノール的一种であるヘスペリジンを用いて *in vivo* で家兔に長期間投与すると、大腿動脈の収縮特性が変化することが明らかになったので、開発した血管培養装置を用いることにより、そのメカニズムの解明が可能になった。

研究成果の概要（英文）： To precisely study the phenomena of the response of biological soft tissues to mechanical stress, long-term culture systems were developed for tendons/ligaments and blood vessels. These systems can be used to study mechanisms of the biomechanical remodeling of these tissues. Moreover, we have found that long-term *in vivo* administration of hesperidin, a kind of polyphenol, affects the contractile response of the femoral artery in rabbits. The mechanisms involved in this phenomenon could also be studied with the vascular culture system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：バイオメカニクス

科研費の分科・細目：人間医工学，医用生体工学・生体材料学

キーワード：リモデリング・血管・腱・靭帯・スティフネスパラメータ・血管収縮能

## 1. 研究開始当初の背景

高血圧症や弁膜症，心筋梗塞などにより心臓に過剰な圧負荷や容積負荷などの力学的負荷が長期にわたって加わると，心筋内の筋原線維が増加し，心壁は肥厚して，単位筋原線維あたりの負荷を減少させて心機能を十分維持できるように変化する．このようにリモデリングした心臓は力学の観点からは合

理的に見えるが，虚血性ショックに弱く，狭心症のような軽度の心筋虚血でも機能不全（心停止）を引き起こすことが問題となっている．また最近では，スポーツにより肥大化した心臓が予兆なく突然機能不全（突然死）を引き起こすことが関心を集めている．これらの理由により，心肥大発生のメカニズムを明らかにする研究は国の内外を問わず関心

が高く、多数の研究が行われている。

心臓におけるリモデリングと同様に、他の生体組織でも力学的負荷に応じて形態や寸法、性質を変えて、機能的に適応し、再構築（リモデリング）するという生体特有の極めて優れた現象を示す。この現象は骨で初めて観察されたこともあって、骨再構築のメカニズムに関する研究が多い。しかしながら、血管や腱・靭帯などの軟組織にもこのような現象が存在することが明らかになったのは近時であり、そのメカニズムには不明な点が多い。

体内の組織には、ホルモンなどの種々の液性因子や神経が作用し、組織の肥大や萎縮、活性化、機能変化等を引き起こして身体の恒常性を保っている。そのため、力学的な負荷そのものが組織・構造におよぼす効果を正確に検討するためには、液性因子や神経等の影響を完全に除外することが理想である。

一方で、ヘスペリジン（ビタミン P）等の物質を長期間血管に作用させると、血管の力学的特性が変化することが考えられている。このような薬品等による血管のリモデリングを明らかにするためにも、他の要因を完全に除外する実験が必要である。

そこで本研究では、摘出した臓器や組織のリモデリングを *in vitro* で発現させる方法を確立し、生体軟組織の機能的適応制御とリモデリングのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、構造や機能が互いに大きく異なる血管と腱・靭帯を取り上げ、生体内で観察されるリモデリング現象を、摘出した組織を用いて *in vitro* で発現させる方法を確立することを目的とした。そのために、各組織を長期間培養することができる装置を開発した。この方法により、体内で組織に作用しているホルモンなどの種々の液性因子や神経活動の影響を完全に除外して、力学的な負荷そのものが及ぼす効果を検討することができる。そして、生体組織に働く力学的負荷を正確に解析し、リモデリングの進行にともなう組織の形態や寸法、力学的特性の変化等を検討することができる。最終的には、生体軟組織の機能的適応制御とリモデリングのメカニズムを明らかにすることに寄与することを旨とする。

さらに、血管長期培養装置により血管拡張作用のあるヘスペリジンを、長期間にわたって血管に投与することによりどのような変化が引き起こされるのかを検討する。本研究では、それに先立ち、家兎に長期間にわたってヘスペリジンを摂取させ、大腿動脈の力学的特性の変化を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 腱・靭帯培養装置の開発

家兎より摘出した膝蓋腱から切り出した幅 300  $\mu\text{m}$  の組織片を 1 週間、任意の負荷 (0 ~ 0.2 N) と温度 (室温 ~ 42°C) で培養できる装置を開発した。まず 3 つの試作装置を試作して、腱・靭帯の培養にとって最適な方法を検討した。装置 1 と装置 2 は、摘出組織を細胞培養に使用するインキュベータに入れて負荷作用下で培養する装置である。装置 1 では組織片を水平に配置し、装置 2 では組織片を垂直に配置する装置である。両者とも組織片の一端を容器の壁にステンレス板を用いて固定し、他端に糸を介して重りをつり下げて、試料に一定の負荷を与えることができるように設計した。装置 3 は、恒温水を循環させる小型のインキュベータ中で組織片を培養する装置であり、組織片の一端に力センサ（ロードセル）を接続し、他端を引っ張ることで組織片に負荷を与える。組織片に与える負荷を常に力センサで測定して、その値が一定になるように組織片の変形を調整しなければならないが、培養中に組織片の力学的特性も測定することができる装置である。いずれの装置でも、インキュベータの温度を調整することによって任意の温度で培養できる。

上記のように、装置 3 で培養した組織片については、装置に取り付けたまま力学試験

（引張試験）を実施できるが、装置 1、2 で培養した組織片については、培養装置から組織片を取り出し、装置 3 に取り付けて力学試験を実施することにした。力学試験ではプレコンディショニング後、ひずみ速度 0.1 %/s で組織片が破断するまで引張り、得られた応力 - ひずみ曲線から弾性係数と引張強度、破断ひずみ等の力学的特性を表すパラメータを算出し、試験中は、培養液中の組織片を 2 方向からビデオカメラで撮像し、厚さ等を測定できるようにした。このようにして、培養前後で試験片の形態、重量、力学的特性を測定する方法を確立し、これらに及ぼす培養中の負荷と温度の影響を検討できるようにした。

### (2) 血管培養装置の開発

家兎より摘出した総頸動脈を 1 週間、任意の灌流圧 (50 ~ 200 mmHg) と灌流流量 (0 ~ 50 mL/min)、温度 (室温 ~ 42°C) で培養できる装置を開発した。培養液を劣化させにくいバイモルポンプを使用して培養液を循環させた。流量のコントロールには、流量計とピエゾバルブが組み込まれたマスフローコントローラを使用し、設定流量になるように自動でピエゾバルブを調節した。灌流培養液を貯める容器に湿らせた 95%  $\text{O}_2$  と 5%  $\text{CO}_2$  の混合ガスを常にバブリングして、培養液中の酸素

濃度を高くするとともに、二酸化炭素濃度を一定にした。この容器を密閉すると灌流圧が上昇し続けるため、容器のフタにニードルバルブを設置して容器内のガスを容器外へ放出するようにした。容器内の圧力のある程度の時間持続するように、ニードルバルブの開度を手動で調節した。そして、バブリングするガスの量をピエゾバルブで制御することにより灌流圧をコントロールした。培養する血管近傍の灌流圧を圧力トランスデューサで測定し、この圧力が目標圧力になるように、ピエゾバルブの開度をコントロール装置により自動制御した。灌流培養回路を恒温器に入れて温度を一定に保った。

また、灌流回路の配置を工夫して、血管を培養装置に取り付けた状態で、力学的特性を測定するための内圧負荷試験が実施できるようにした。この試験では、ビデオカメラを使用して血管を撮像し、ビデオ・ディメンジョン・アナライザを使用して血管外径を測定した。また、培養液を貯める容器に混合ガスの代わりに加圧ユニットを接続し、プレコンディショニング後、3 mmHg/s の速度で灌流圧を 0 mmHg~200 mmHg の範囲で繰り返し増減できるようにした。その結果得られた内圧-外径関係から血管のスティフネスを表すパラメータを算出した。このようにして、培養前後、培養中の血管の力学的特性が測定できるようにした。

### (3) ヘスペリジン (ビタミンP) による血管リモデリングの検証

雌の日本白色種家兔 (体重  $2.9 \pm 0.1$  kg) に、ヘスペリジンに糖を結合して水に溶けやすくした  $\alpha$ -glucosylhesperidin (High 群: 4500 mg/day, Low 群: 150 mg/day) を約 23 週間にわたって飲水投与し、正常水を与えた Normal 群と比較した。解剖開始前に体重を、解剖中に大腿動脈の血流量と腹部大動脈付近の血圧を計測した。摘出した大腿動脈を Krebs-Ringer bicarbonate buffer solution (KRS) に入れ、4°C で 12~24 時間保存した。内圧負荷試験前に血管を室温に戻し、生体内の長さまで軸方向に伸張して内圧負荷試験装置に接続し、37°C の KRS 中に浸漬した。まず、血管内圧を 15 mmHg から 150 mmHg まで加圧し、次いで 150 mmHg から 15 mmHg まで減圧するサイクルを内圧-外径関係が安定するまで繰り返したのち、安定した内圧-外径関係を Control-1 として記録した。次に、内圧を 100 mmHg に加圧した状態で、ノルエピネフリンを  $10^{-5}$  M の濃度になるように血管内灌流液に加えて血管を収縮させた。収縮が最大になったのを確認したのち、内圧を 0 mmHg に減圧し、15 mmHg から 150 mmHg まで加圧、次いで 150 mmHg から 15 mmHg まで減圧し、この間の内圧-外径関係を 1st NEPI として記

録した。さらに、血管の内圧-外径関係が安定するまで加圧と減圧を繰り返し、安定した内圧-外径関係を NEPI として記録した。試験終了後、血管外内槽を KRS で 3 回以上洗ってノルエピネフリンを除去したのち、新しい KRS に置換して血管の内圧-外径関係が安定するまで加圧、減圧を繰り返し、安定した内圧-外径関係を Control-2 として記録した。

得られた内圧-外径関係から、血管の収縮特性を表す径変化率と血管のスティフネスを表すパラメータを算出した。このようにして  $\alpha$ -glucosylhesperidin の長期間投与の影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 腱・靭帯培養装置の開発

試作装置 1 と 2 を用いて家兔膝蓋腱から切り出した組織片を培養し、コンタミネーションを起こさずに 1 週間培養できることを確認した。試作装置 3 については、十分に洗浄・滅菌することが難しく培養前に汚れが残るなど、培養には適さないことがわかった。

装置 1, 2 で負荷を与えながら培養した組織片のうち数本は培養中に破断した。組織片を切り出す際に肉眼では観察されない傷が付いた可能性と、酸素と栄養分が組織片の中心部まで浸透せずに細胞が壊死した可能性が考えられたが、結論を出すことはできなかった。

1 週間破断せずに培養できた組織片を引張試験し、組織片の力学的特性を測定できることがわかった。しかし、組織片を装置に取り付ける際に、試料固定のための接着剤が試料の広い範囲に浸潤したり、接着不良で試験中に剥がれたり、低い荷重で線維間が滑るように破断する場合があった。これらのことから、組織片を把持するための接着方法をさらに検討する必要があることが明らかになった。

### (2) 血管培養装置の開発

作製した血管培養装置に対して、37.0°C、流量 5.0 mL/min、圧力 100 mmHg の条件で水を 1 週間循環してこれらの変動を調べた。その結果、当初 23.1°C (室温) であった水は恒温槽に入れてから 180 分で 36.9°C になり、その後は変化しないことがわかった。流量については、平均 4.9 mL/min、標準偏差 0.02 mL/min、最大 5.1 mL/min、最小 4.8 mL/min の範囲内でほとんど変動しないことが確認できた。圧力については、平均 99.7 mmHg、標準偏差 0.26 mmHg、最大 100.7 mmHg、最小 98.2 mmHg の結果が得られ、ほとんど変動しないことが確認できた。

家兔から摘出した総頸動脈を 1 週間培養した結果、コンタミネーションを起こさずに培養することができることが確認できた。しかし、途中で流量計に気泡が入り流量を正常に

計測することができないことがあった。そのため、流量計の上流側に気泡を取り除くための小型チャンバを設置する必要があることがわかった。

培養装置に加圧ユニットを接続し、総頸動脈の力学試験を実施した。その結果、血管を培養装置に取り付けたまま、かつ培養装置を恒温器に入れたまま、血管の内圧負荷試験が実施できることが確認できた。この方法を用いれば、培養前後だけでなく、培養中の血管の力学的特性も測定することができると考えられる。

### (3) ヘスペリジン (ビタミンP) による血管リモデリングの検証

血管摘出直前の High 群と Low 群の体重は Normal 群との間に有意差はみられなかった。また、High 群と Low 群の平均血流量は Normal 群との間に有意差はみられなかったが、High 群の平均血圧は Normal 群より有意に高かった。得られた内圧-外径関係をもとに求めた平均血圧下の血管外径は、High 群の方が Normal 群より有意に小さかった。

血漿中におけるヘスペレチン ( $\alpha$ -glucosylhesperidin の代謝物) の濃度は、High 群で高かったが投与期間内の変動はほとんどみられなかった。

1st NEPI では、すべての内圧範囲で High 群と Low 群の径変化率は Normal 群より小さかったが、有意差は認められなかった。加圧、減圧を繰り返したあとの NEPI では、80 mmHg から 150 mmHg の範囲で、High 群の径変化率は Normal 群より有意に小さかった。また、20 mmHg から 150 mmHg の範囲で、Low 群の径変化率は Normal 群より有意に小さかった。ステイフネスパラメータについては、血管収縮にもなって低下したが、いずれの場合でも群間の有意差はみられなかった。

これらの結果から、 $\alpha$ -glucosylhesperidin の長期間投与によって、ノルエピネフリンによる血管収縮が抑制されることがわかった。

今後さらに検討しなければならない事項が幾つか残されているものの、腱・靭帯と血管を長期間培養できる装置を開発することができた。これらの装置を使用して生体軟組織のリモデリングを *in vitro* で発現させ、そのメカニズムを明らかにする研究が可能になった。また、ヘスペリジンのような物質の長期間にわたる *in vivo* 投与が動脈の力学的特性に及ぼす影響を明らかにした。血管培養装置により *in vitro* で同様な実験を実施することが可能であるので、この方法によってそのメカニズムを明らかにすることができるものと考えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① 黒瀬裕貴, 内貴猛, 林紘三郎, 宅見央子, 米谷 俊, フラボノイドの *in vivo* 投与が家兔大腿動脈の収縮弛緩に及ぼす効果, 第 22 回バイオフィロンティア講演会講演論文集, 査読無, 11-14, 2011, 79-80.
- ② 古川育代, 宅見央子, 藤嶋昇, 白石浩荘, 米谷俊, 内貴猛, 林紘三郎, 家兔大腿動脈におけるヘスペレチンの血管拡張作用, 第 22 回バイオエンジニアリング講演会講演論文集, 査読無, 09-55, 2010, 25.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 黒瀬裕貴, 内貴猛, 林紘三郎, 宅見央子, 米谷 俊, フラボノイドの *in vivo* 投与が家兔大腿動脈の収縮弛緩に及ぼす効果, 第 22 回バイオフィロンティア講演会, 2011 年 10 月 8 日, アストプラザ (津市).
- ② 黒瀬裕貴, 内貴猛, 林紘三郎, 宅見央子, 米谷 俊,  $\alpha$ G ヘスペリジンの長期投与が家兔大腿動脈の力学的特性におよぼす効果, 日本機械学会中国四国学生会第 41 回学生員卒業研究発表講演会, 2011 年 3 月 4 日, 岡山理科大学 (岡山市).
- ③ T. Kometani, I. Furukawa, T. Naiki, K. hayashi, Vasodilating effects of  $\alpha$ -Glucosylhesperidin on rabbit femoral arteries contracted by noradrenalin, 6th World Congress of Biomechanics, 2010 年 8 月 3 日, Suntec Convention Centre (Singapore).
- ④ 古川育代, 宅見央子, 藤嶋昇, 白石浩荘, 米谷俊, 内貴猛, 林紘三郎, 家兔大腿動脈におけるヘスペレチンの血管拡張作用, 第 22 回バイオエンジニアリング講演会, 2010 年 1 月 9 日, 岡山理科大学 (岡山市).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

林 紘三郎 (HAYASHI KOZABURO)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号: 90026196

### (2) 研究分担者

内貴 猛 (NAIKI TAKERU)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号: 40241385  
八田 貴 (HATTA TAKASHI)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号: 00218497  
市場 晋吾 (ICHIBA SHINGO)  
岡山理科大学・工学部・教授  
研究者番号: 30284102