

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 20 日現在

機関番号：82723

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21560195

研究課題名（和文）生理学的応力環境での内皮細胞メカノセンシングと機能応答に関する研究

研究課題名（英文）Mechanosensing in vascular endothelial cells and its response to the physiological stress environment

研究代表者

多田 茂 (TADA SHIGERU)

防衛大学校・応用科学群・教授

研究者番号：70251650

研究成果の概要（和文）：本研究では、生体の恒常性維持に関わる重要な指標の一つである血管内皮細胞の一酸化窒素(NO)産生能、ならびに細胞の酸素代謝能についてせん断応力負荷に対する応答変化を調べ、生理学的環境下での力学的刺激と細胞機能異変との関連について明らかにすることを目的とし、血管内皮細胞、もしくは血管細胞、血管組織に関して、次の3項目 1) せん断応力刺激による NO 活性機構、2) 動脈壁内部の細胞での LDL 輸送機構、3) 頸動脈分岐部での酸素輸送機構、について調べた。1.については、内皮細胞が二系統のせん断応力刺激による産生機構を有することを予想し実験を行った。その結果、遺伝子レベルで調節が行われる NO 産生機構については、転写因子レベルでは活性が確認されたものの、蛋白レベルでは十分に確認できず、長時間の応力付加が必要であることが予想された。2.については、血管平滑筋細胞の LDL 代謝機構のせん断応力依存性について調べた。その結果、内皮細胞が持つ LDL 代謝機構のせん断応力依存性と同程度の機能が平滑筋細胞にも実現されると仮定した場合、そうでない場合に比べ、動脈組織内での著しい LDL 代謝の増進が予想された。これは内皮細胞層での LDL 透過率によっても多大な影響を受けることが考えられる。3.については、若年層と老年層の頸動脈分岐部形状を模擬した動脈壁内部における酸素代謝のシミュレーションを行った。その結果、加齢と共に血行力学的な危険因子(低酸素、低せん断応力)が頸動脈分岐部で増大することが予想された。これは加齢と共に血管の形状や内皮細胞の状態が変化し、せん断応力刺激に対する細胞の機能応答が大きく変化するためであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The present study demonstrated that : I) Exposure of cultured bovine aortic endothelial cells (BAEC) to fluid flow resulted in nitric oxide (NO) production and up-regulation of intracellular calcium ion concentration ($[Ca^{2+}]_i$), monitored by fluorescent dyes of DAF2-DA and Rhod2-DA, respectively using a confocal laser scanning microscope, II) A two-dimensional (2-D) numerical simulation of a convective-diffusive transport of LDL in the artery wall coupled with the wall shear stress gradient (WSSG) dependent LDL consumption of smooth muscle cells (SMCs) resulted in a strong dependence of LDL uptake of SMCs on WSSG for cells right beneath the fenestral pores, and III) Construction of a three-dimensional models of bifurcations with two different bifurcation angles mimicking the real bifurcation anatomy to perform simulations of steady blood flow under the wall boundary condition of a constant oxygen concentration, resulted in the significant alternation of the distribution and the magnitude of the oxygen wall flux separation at the outer common-internal carotid wall, depending strongly on the bifurcation angle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	90,000	1,890,000
2010 年度	900,000	45,000	945,000
2011 年度	900,000	45,000	945,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	180,000	3,780,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体力学

キーワード：バイオ流体力学

1. 研究開始当初の背景

粥状(アテローム性)動脈硬化症が好発する血管部位(動脈硬化好発部)は流体力学的に見て二次流れ・剥離流により血流が乱れやすい場所である。そのため動脈硬化好発部での複雑な血流により誘起されるせん断応力場やそれに伴う物質輸送、あるいは動脈壁の変形や応力分布などが動脈硬化発症・進展の鍵を握っていると考えられている。しかしながら、これらの諸因子と病変の形成機序との関係については詳細が未だ明らかではない。

従来の研究では、主にせん断応力と血管内皮細胞の生理活性機能との関連に対し焦点が絞られ、動脈硬化病変の発症・進展メカニズム解明に向けた数多くの報告がなされている。しかしながら、動脈硬化における未解決な難題である『病変の限局性』、あるいは『病変が低せん断応力部位に好発する』理由を明瞭に説明するには未だ至っていない。

過去に本研究代表者らは動脈硬化好発部の特徴として『低せん断応力』に加え、『血管壁の大きな伸張』が現れることを大規模流体-構造連成(FSI)解析により見出ししている。動脈硬化好発部位で生じるせん断応力と壁伸張の複雑な時間履歴の組み合わせが、血管内皮細胞(VEC)の機能異変(例えば動脈硬化抑制物質である、一酸化窒素の産生能の低下やコレステロールなどの物質透過性の亢進)を誘起する力学的刺激になっていると考えられる。特に細胞がさらされる応力環境の力学的機構・作用と、細胞の機能活性との因果関係については、その後引き続き行った理論解析、イオンチャンネルのMDシミュレーションを通じて全体像がおぼろげながら浮かび上がってきているものの、その先にある、機能応答を司る細胞生物学的機構に関しては定説も確立されておらず、詳細が未だ不明である。

2. 研究の目的

動脈硬化好発部に特有な周期的せん断応力が血管細胞の生理活性に多大な影響を及ぼしていると予想される。そのため、本研究では、恒常性維持に関わる重要な指標の一つである VEC の一酸化窒素(NO)産生能、ならびに細胞の酸素代謝能について、上記応力負荷に対する応答変化を調べ、生理学的環境下での力学的刺激と細胞機能異変との関連について明らかにすることを目的としている。

具体的には生理学的なせん断応力を培養ウシ大動脈内皮細胞(BAEC)に負荷する実験と動脈組織を模擬した数値解析を行い、細胞

の恒常性維持に重要な役割を果たす生体分子(NO, LDL, O₂)の産生・代謝能の応答変化を調べ、生理学的な力学環境がどのような仕組みと経路で細胞機能に関与するのかということ、主に細胞生物学的側面に重点をおき、明らかにすることを試みる。

3. 研究の方法

本研究課題が目標とする、せん断応力・壁伸張といった力学的刺激と血管細胞・組織における機能異変との生理学的関係の解明について、以下に挙げる3項目について調べた。

3.1. せん断応力刺激による NO 活性機構

血管内皮細胞で産生される一酸化窒素(NO)は、血球細胞等の血管壁への接着や、平滑筋細胞の遊走・増殖の抑制作用を持つことから、抗動脈硬化的な生体分子として知られている。しかしながら、血中 NO 濃度が過度に上昇すると、免疫防御機能を阻害する活性酸素種が合成され、NO が逆に「動脈硬化症を亢進させる」ということになる可能性も示唆されている。このような NO の興味深い振る舞いの仕組みは現在でも詳しく分かっていない。本研究では、NO の過剰産生のメカニズムに対し、図1に示す NO 活性についてのシナリオを描いた。この仮説を検証するための第一歩として、まず、一酸化窒素合成酵素(NOS)の機能発現について調べることを念頭に置き、NO 濃度分布とカルシウムイオン(Ca²⁺)濃度分布との相関をバイオイメージング法により調べた。さらに、誘導型 NOS(iNOS)が内皮型 NOS(eNOS)と同様に、せん断応力刺激に対するBAECの機能応答として発現される可能性について分子生物学的手法による検証を行った。

3.1.1. 実験装置および方法 細胞試料には細胞試料には第8~12継代のBAECを用いた。培養培地には DMEM (Sigma D6546)に Penicillin- Streptomycin (Sigma P0781), FBS (10% v/v) (BTW S1560)と L-Glutamine (Sigma 49419)を添加したものをを用いた。添加物の最

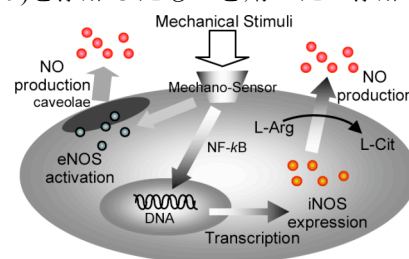


Fig.1 NO production in response to mechanical stimuli

終 mol 濃度については、添付のプロトコルに依った。培養はφ90 のプラスチック Dish で 5%CO₂ 雰囲気インキュベーターを用いて行った。継代に際しては、細胞層の剥離には 0.02% Trypsin-EDTA (Sigma T4799)溶液を用い、細胞の回収は遠心分離を 600rpm で 5 分間行った。

実験装置の概略を図 2 に示す。供試流体には Phenol-Red Free の低 Glucose タイプの DMEM (Sigma D5030)培地を用いた。流体流量は血流ポンプ(HARVARD APPARATUS 55-1838)により制御する。この血流ポンプは心臓の収縮期に相当する急峻なピークを有する生理的な拍動流を生成することが可能である。実験試料は、100 μg/ml Fibronectin (Sigma F4759)を塗布・UV 滅菌処理された φ 30 の石英プレートをガラス Dish 内に入れた後、実験 2 日前に BAEC を播種し培養することで作成した。図 3 に示す、実験試料を設置したテストセクション部で流体力学的せん断応力を BAEC に負荷する。幅 20mm、高さ 2mm の矩形流路を有するテストセクション部には、厚さ 1mm のスペーサーを挿入してバックステップ部を設け、流れの剥離・再付着が生じる動脈分岐部の流れ場を再現している。

バイオイメーキングのための NO の蛍光プローブには DAF2-DA(積水メディカ 423727)、Ca²⁺の蛍光プローブには Rhod2-DA(同仁 R-002)をそれぞれ用いた。蛍光プローブの細胞への Loading は、遮光下にて培養細胞に DAF2-DA(10μM) 500μl および Rhod2-DA (10μM) 500μl, PBS(-) 500μl を添加し、37°C で約 30 分間インキュベートして行った。バイオイメーキング法には共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Olympus FV1000) を用いた。DAF2-DA の光源には Ar レーザー(30mW 488nm)を、Rhod2-DA の光源には He-Ne レーザー(1mW 543nm)を用いた。

また、上記の実験とは別に、ウェスタンブロット法による免疫染色で NOS 発現の検出を試みた。

φ 90 の Dish に細胞を培養し、回転円板型のせん断応力負荷装置を用い、温度 37°C で 120 分間 0.2 Pa のせん断応力を負荷した。また、培地濃度と pH を一定に保つため、飽和水蒸気と炭酸ガスを供給した。せん断応力負

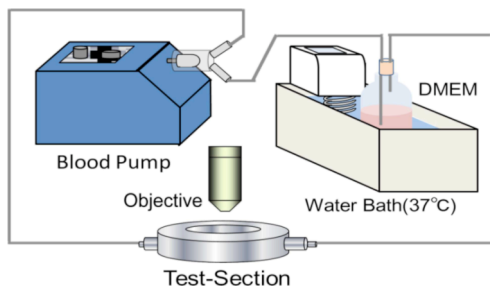


Fig.2 Schematic of the experimental setup

荷後はウェスタンブロット法により NOS の発現について調べた。NOS は内皮型(eNOS)と誘導型(iNOS)について発現の有無を調べた。一次抗体に eNOS Mouse IgG1, iNOS Mouse IgG1 (Becton Dickinson)を、二次抗体には Anti-Mouse Goat IgG (Sigma A3688)を用い、発色は AP 法を用いた。

3.1.2. 実験結果及び考察 時間平均せん断応力 1 Pa を BAEC に 5 分間負荷した後、DAF2-DA, Rhod2-DA による二重染色を行い、剥離流が再付着する位置近傍の BAEC を選んで蛍光染色像を観察した。血流ポンプの流量については、テストセクションのバックステップ下流部でおよそ 1 Pa のせん断応力が生じる流量を汎用流体ソフトウェア(Fluent6.3 ANSYS)を用いて求め(図 4)、その流量値を血流ポンプの時間平均流量に設定した。

蛍光計測の結果を図 5 に示す。せん断応力負荷後の細胞は、コントロール(無負荷)と比較して DAF2-DA の蛍光強度が強まり、せん断応力負荷により NO が産生されていることがわかる。一方、拍動流と定常流の違いによる蛍光強度の有意な差は今回行った 5 分間の実験では認められなかった。Rhod2-DA による [Ca²⁺]_i 分布についても同様で、コントロールと比較して蛍光強度は高まっている。また、Ca²⁺の蛍光強度分布と NO の分布との間に相関が認められることから、計測された NO は主に eNOS の活性化により産生されたものであると考えられる。さらに、せん断応力負荷と NO 濃度・分布の関係を見るために Ca²⁺チャンネル阻害剤である Gadolinium (Sigma G7532)を用いて、細胞外部からの Ca²⁺流入を遮断して観察した。しかしながら、せん断応力負荷後も [Ca²⁺]_i 分布が見られたことから、細胞内の Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出が行われたと考えられる。ウェスタンブロット法を用いて、eNOS, iNOS の発現を調べた。この結果より、eNOS については、AP 染色によるバンドが検出されたが、iNOS については有意なバンドは検出されなかった。iNOS のタンパクが検出されなかった理由としては、そも

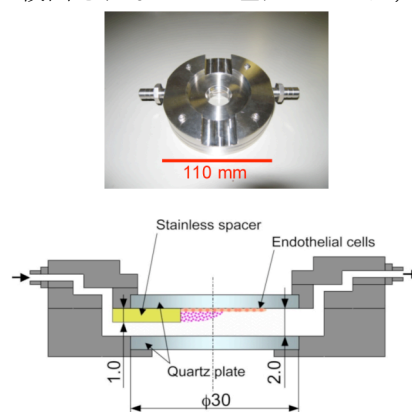
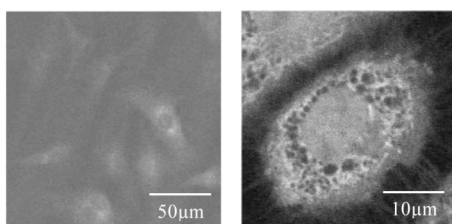
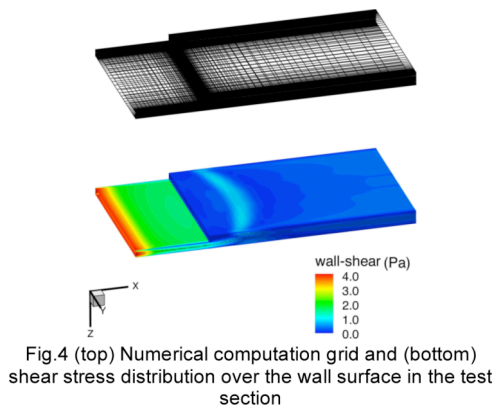


Fig.3 (top) Photograph of the experimental test section, and (bottom) geometry and dimensions of the test section.

そもそもせん断応力では iNOS が発現されないということ、発現は予想されるが、その発現が今回、何らかの理由によって阻害されていることが考えられる。このことについて考察するために、iNOS の遺伝子発現を担う転写因子 NF- κ B の発現の有無を ELISA 法により調べた。その結果、せん断応力負荷を与えた BAEC では NF- κ B が発現したことが示され、せん断応力負荷に対する BAEC の応答変化として、遺伝子レベルでの iNOS の転写が行われている可能性が示された。ただ、今回の場合では eNOS の機構とは異なり、iNOS は刺激を受けてからタンパクに翻訳されるまでに時間を要することが考えられることから、有意な検出を行うためには数時間～1日のオーダーでせん断応力を負荷する必要があると予想されるが、これについては今後の課題である。

3.1.3. まとめ 動脈硬化症好発部位である動脈分岐部を模擬した流路を作製し、培養ウシ大動脈内皮細胞を用いて、せん断応力と細胞の NO 産生能、及び $[Ca^{2+}]_i$ 分布との関係をバイオイメーキング法により調べた。せん断応力により NO 濃度と $[Ca^{2+}]_i$ が共に上昇したため、産生された NO は eNOS 由来であることが推測される。また、産生された NO が eNOS のみならず、iNOS 由来でもある可能性について、ウェスタンブロット法により調べたところ、eNOS は検出されたが、iNOS は検出されなかった。一方、iNOS の発現を担う転写因子 NF- κ B の発現を ELISA 法で調べたところ、せん断応力を負荷した細胞では、有意な発現が認められた。

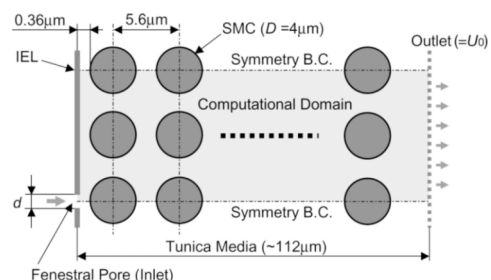
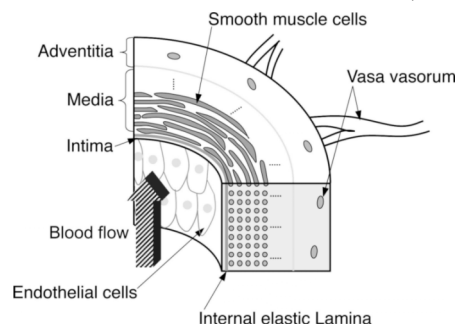
3.2. 動脈壁内部の細胞での LDL 輸送機構



動脈硬化症が発症・進展する主因は図 6 に示す血管内皮細胞直下に低比重リポ蛋白 (LDL) が沈着し、さらに中膜より遊走した平滑筋細胞 (SMC) がそこで異常増殖することにある。しかしながら、その発端が何に由来するのかということについては未だ明確な回答は得られていない。従来、血流による力学的刺激が病変発症機序に強く関与していると考えられており、最近の研究では動脈壁内部での浸透流によるせん断応力が血管の物質透過性、言い換えれば動脈壁内部の物質輸送機構に影響を与える事が報告されている。このことから本研究では動脈壁内部での細胞のせん断応力刺激応答と物質輸送機構との関連について詳細を明らかにすることが重要な課題であると考え、動脈壁内部の内弾性板直下の中膜に位置する SMC 層での LDL 物質代謝と輸送機構とに着目し、数値解析的に調べた。

3.2.1. 数値解析モデル及び方法 内膜 (Intima) 下の内弾性板 (Internal Elastic Lamina : 以下 IEL) 近傍に位置する SMC は、IEL の空孔 (Fenestral pore) から中膜の細胞外マトリクス内に吹き出す浸透流 (Transmural Flow) による強いせん断応力 (0.5-1Pa) に曝されることが示唆されており、細胞表面での生体物質代謝に関しては、中膜のより深部に位置する細胞とは著しく異なった生理的環境下に置かれていると予想される。本研究ではこのことに着目し、『内膜直下』という病理学上意義深い領域に位置する SMC 周りの流れと物質輸送、細胞表面での LDL 物質代謝をモデル化して二次元 (2D) 数値解析を行い、動脈壁内部の LDL 物質輸送機構について調べた。

計算領域の一例を図 7 に示す。中膜 (Tunica



media)はラット胸部大動脈をモデル化しており, SMCは直径 4×10^{-6} [m]の円柱状, 細胞層は20層, SMCの充填率は0.4とした. 従って中膜の厚さは 112×10^{-6} [m]となり, 実測値($120 \sim 150 \times 10^{-6}$ [m])とほぼ等しい. IELと第一層目のSMCとの距離はSEMデータを用い, 0.36×10^{-6} [m]とした. SMC表面の境界条件は細胞外マトリックスとSMCの透過係数の値の比が非常に大きい「不透過・滑りなし」条件とした. IELにも同様の境界条件を与えた. IELの空孔はIEL上に格子状に規則正しく分布していると仮定した. 本研究では2Dモデルを仮定しているため, 実際の円形状の空孔を開口面積が等しい2次元スリットに等価的に置き換え, そのスリット幅を「空孔径」とした. 流れ場の方程式は, 細胞外マトリックス内の流れを記述するBrinkman方程式と連続の式

$$\nabla P = \mu \nabla^2 \mathbf{u} - \frac{\mu}{K_p} \mathbf{u} \quad (1)$$

$$\nabla \cdot \mathbf{u} = 0 \quad (2)$$

である. ここで P は圧力, μ は粘性係数, \mathbf{u} は速度ベクトル, K_p は透過率である. K_p は細胞外マトリックスを形成するファイバー直径 r_f , 細胞外マトリックスの空隙率 ε , Kozeny定数 C_k によって

$$K_p = \frac{r_f^2 \varepsilon^3}{4C_k(1-\varepsilon)} \quad (3)$$

と表される. $r_f = 3.22 \times 10^{-9}$ [m], $\varepsilon = 0.43$, $C_k = 5.02$ より細胞外マトリックスの透過率は $K_p = 1.43 \times 10^{-18}$ [m²]となる.

SMC表面のLDL吸収・反応モデルにはMichaelis-Menten速度論で近似した疑似一次反応モデルを採用し, 有効反応速度定数を $k_r = 2.2 \times 10^{-10}$ [m/s], 有効拡散係数は $D_f = 5.0 \times 10^{-14}$ [m²/s]とした. LDLの移流拡散方程式は C を濃度として

$$K_{ef} \mathbf{u} \cdot \text{grad} C = D_f \Delta C \quad (4)$$

で与えられる. ここで K_{ef} は細胞外マトリックスにおける対流輸送のLag coefficientである. さらにLDL吸収・反応機構にせん断応力による依存性を持たせるため, k_r を

$$k_r(\tau_w) = 4.14 \times 10^{-9} \left[1 + 4.38 \left(\frac{\partial \tau_w}{\partial s} \left/ \left| \frac{\partial \tau_w}{\partial s} \right|_0 \right)^{\gamma} \right] \quad (5)$$

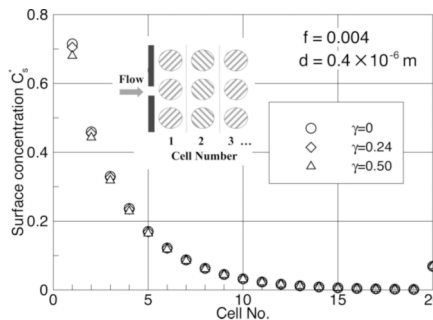


Fig.8 Profiles of LDL concentration on SMCs in the direction of the interstitial flow

と仮定し, k_r を細胞表面のせん断応力こう配の関数として表した. ここで, 添え字0は参照値(一様流での値)を示し, γ はモデルパラメーター($0 < \gamma$)である. 数値解析には有限要素流体解析ソフトウェアFIDAP (Ver.8.62 FLUENT)を用いた. 計算格子には境界適合型構造格子を用い, SMCとIEL表面における境界層の分解能の確保のため最小格子間隔を 1×10^{-10} [m]とした. 格子点数は約200,000点である. 解析で用いた主な生理学的パラメータを表1に示す.

3.2.2. 数値シミュレーション結果 中膜内のSMC表面におけるLDL濃度分布を図8に示す. 空孔率 f を

$$f = \frac{\pi d^2}{4l^2} \quad (6)$$

(l :隣接する空孔の中心距離)とし, $f=0.004$, 孔径 0.4×10^{-6} [m]とした. LDLは流れによる輸送を受ける対流律速型であり, 流れに乗って中膜深部に浸透してゆく. しかしSMC表面での吸収があるため, 中膜深部での濃度は低い. また, LDL吸収機構(LDL濃度)のせん断応力こう配依存性はIEL近傍の細胞層に現れ, 特にIEL直下の細胞層で顕著であることがわかる. 次にLDL吸収のせん断応力こう配依存性について調べた. せん断応力こう配依存性が最も顕著に現れたIEL直下のSMCに注目し, 空孔径を変化させることにより, この細胞での周平均LDL流束のせん断応力こう配依存性について調べた. その結果を図9に示す. ただしIEL単位面積当たりのLDL流束は一定としている. LDL流束のせん断応力こう配依存性は空孔径の増加と共に急激に増大することがわかる. この理由として, SMC表面における, 空孔から流入する浸透流の投影面積が空孔径の増大と共に増加する

Table 1 Physiological parameters

Parameter	Value
LDL Diffusivity D_f [m ² /s]	5.0×10^{-14}
Pore diameter d [m]	$0.4 \sim 3.2 \times 10^{-6}$
SMC volume fraction F	0.4
Pore area fraction f	0.004
Lag coefficient K_{ef}	2.00
Permeability K_p [m ²]	1.43×10^{-18}
Rate constant k_r [m/s]	2.20×10^{-10}
Superficial velocity U_0 [m/s]	5.80×10^{-8}
Viscosity μ [Pa s]	6.86×10^{-4}
Fluid density ρ [kg/m ³]	1.05×10^3

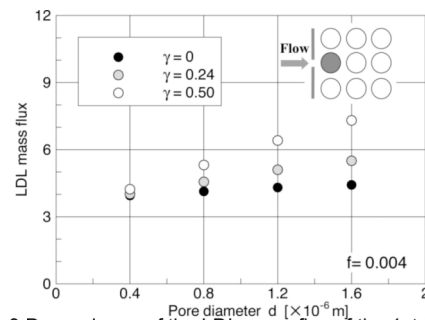


Fig.9 Dependence of the LDL mass flux of the 1st SMC on the model parameter γ for various pore sizes.

ことが考えられる。

3.2.3. まとめ 動脈中膜部を模擬した 2D 数値解析を行い、SMC の LDL 吸収・反応機構と、そのせん断応力こう配依存性について調べた。その結果、LDL 吸収率のせん断応力こう配依存性は IEL 近傍の SMC に顕著に表れ、IEL の空孔径にも強く影響を受けることが判明した。ヒト動脈壁では IEL の空孔径はおよそ $1.0\sim 2.0 \times 10^{-6}$ [m] であることが知られている。従って今回得られた結果(図 9)は、IEL 近傍に位置する SMC の生理活性が内膜肥厚等の病変形成に強く関与している可能性を示唆する。

3.3. 頸動脈分岐部での酸素輸送機構

頸動脈分岐部での動脈硬化の発症・進展には様々な物理的因子が関与することが示唆されており、WSS の大きさ・分布とならび、分岐部幾何形状が酸素や低比重リポ蛋白といった生体物質の輸送機構に強く影響を及ぼすと考えられている。

Fisher らは内頸動脈(Internal carotid artery : 以下 ICA)と外頸動脈(External carotid artery : 以下 ECA)の開き角 (図 10, $\theta_1+\theta_2$)・ICA/CCA 断面積比と ICA の狭窄率との相関について 300 以上の臨床データを下に検討を加えており、断面積比と ICA 狭窄率に正の相関があることを示している。Harrison らも開き角と ICA 狭窄率に正の相関があることを示している。Perktold らは頸動脈分岐部の平均値モデルを用いて Sinus 形状と開き角を様々に変化させた三次元非定常流れ場の数値解析を行い、幾何学形状が再循環領域の分布を決める重要な因子である事を指摘している。また、近年では加齢と共に WSS 分布が疾病のリスク側にシフトする可能性があることを明らかにしている。このように、動脈の幾何形状と動脈硬化疾患との関連について調べた報告例が出始めているが、幾何学的因子と物質

輸送機構との関連について調べた報告例は未だ見受けられない。以上より、頸動脈分岐部の開き角と ICA:ECA 流量比に着目し、これらの物理的因子が分岐部での酸素輸送機構に与える影響について調べた。

3.3.1. 数値解析モデルおよび方法 分岐部における血行力学場の一般的な特徴を抽出するため、分岐部形状には図 10 に示す平均値モデルを採用した。CCA, ICA, そして ECA 各血管の直径比と内膜肥厚との関連については多くの報告例がある。しかしながら、個人差を除外すれば性別・年齢や、循環器病罹患率・非罹患率の違いによる明確な差は直径比の値には現れていない。一方で ECA 下流部での狭窄や閉塞による ECA 血流量変化が Sinus 部での WSS 分布などに影響を与えることが報告されている。そこで本研究では直径比よりもむしろ流量比の方が病変との関連が高いと予想し、直径比については臨床データにより得られた平均値を採用し、流量比を臨床データを参考にして変化させた(表 1)。ICA と ECA の開き角については、ごく最近 Thomas らが若年層 (24 ± 4 歳)と年配層 (63 ± 10 歳)とでは開き角に明確な違いがあるという極めて興味深い報告をしている。本研究では彼らの報告例に倣い、 θ_1 と θ_2 とを二通りに変化させ、若年層モデル (Case1), 年配層モデル(Case2)とした(表 1)。血流については時間平均流量が同じである場合、定常流解析による WSS の大きさ・分布形状が実際の脈動波形を用いて求められる時間平均 WSS のそれらと比較してほとんど違いがないことから、簡略化のため定常流を仮定した。血液は密度 $\rho=1.05\text{g/cm}^3$, 粘性係数 $\mu=3.5 \times 10^{-2}\text{dyne s/cm}^2$ の Newton 流体を仮定した。

動脈壁での酸素輸送の境界条件は

$$k_L (PO_{2b} - PO_{2s}) = \frac{\dot{Q}T}{k} \quad (7)$$

と表せる。ここで k_L , PO_{2b} , PO_{2s} , \dot{Q} , T , k はそれぞれ酸素輸送係数、血中酸素の Bulk 分圧、動脈壁面の酸素分圧、動脈組織の単位体積当たりの酸素消費率、動脈内壁面から動脈壁内の酸素分圧が極小値をとる位置までの距離、そして血中酸素溶解度である。酸素分圧の計算では簡便のため、動脈内壁面で酸素分圧 $PO_{2s}=0$ mmHg を与え、液相の輸送方程式のみを解いて酸素分圧を求めた。この近似は輸送律速が支配的になる酸素では比較的良い近似になる。酸素の Bulk 分圧は

$$PO_{2b} = \frac{\int_{V_0} PO_2 \cdot u \, dv}{\int_{V_0} u \, dv} \quad (8)$$

(V_0 は分岐管全域)なので Sherwood 数(Sh)は、式(7)より k_L を

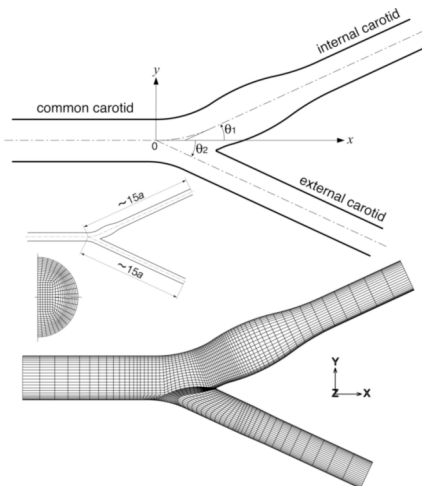


Fig. 10 Three-dimensional model geometry of the carotid bifurcation (top), and grid system (bottom).

$$k_L = \frac{-D \frac{\partial PO_2}{\partial n} \Big|_s}{PO_{2_b} - PO_{2_s}} \quad (9)$$

として

$$Sh = k_L \frac{a}{D} \quad (10)$$

ただし、 a は CCA 直径(=0.6 cm)、 D は血中酸素の拡散係数(=1.2×10⁻⁵ cm²/s)である。

数値解析は FIDAP (Ver. 8.7.2, Fluent Inc.) を用い、Gauss 直接法により行った。計算格子には約 70,000 個の六面体 FEM 要素を用いた。ICA 下流端の流出境界条件が分岐部の流れ場に影響を及ぼさないようにするため、Sinus 下流部の ICA の長さには CCA 直径(=6.0mm) の約 15 倍の値を取ってある。境界条件は、CCA 流入境界と ICA 流出境界で回転放物面状の速度分布を与え、CCA 流入境界の平均流速 U_m には臨床的に得られた CCA 血流脈動波形の時間平均値 $U_m=24.9$ cm/s を与えた。ECA 出口境界は自由発達とした。反復計算は、速度場の相対変化が 10⁻⁶ 以下に達した時に計算が収束したと判定し終了した。

3.3.2. 結果及び考察 分岐管の幾何形状が表 2 に示す Case 1, Case 2, 流量比が 58:42, 80:20 の場合について解析を行った。紙面の都合上、流量比が 58:42 の結果のみを示す。図

Table 2 Representative dimensions of the bifurcation and model parameters.

	Case 1	Case 2	Ref.
CCA diameter ($\times a$)	1.00	1.00	5, 6
ICA diameter ($\times a$)	0.74	0.74	5, 6
ECA diameter ($\times a$)	0.65	0.65	5, 6
θ_1 (deg.)	23.0	40.0	10
θ_2 (deg.)	25.0	39.0	10
ICA:ECA flow ratio	58:42, 80:20		8, 13

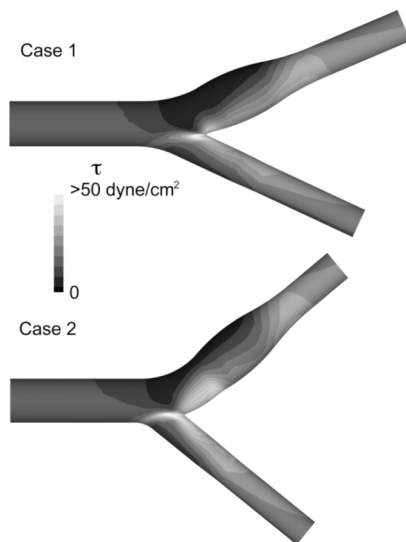


Fig. 11 Contours of the WSS distribution over the bifurcation wall at the flow ratio of ICA:ECA=58:42 for Case

11 は Case 1, Case 2, それぞれの場合についての WSS 分布である。開き角が大きくなると分岐部外壁部の低 WSS 領域が流れ方向に広がることが分かる。また、開き角が大きくなると Apex 近傍の流れ場は急角度に向きを変えられるため、ICA 内壁に沿って高 WSS の領域が広がり、Sinus 部の低 WSS 領域は相対的に狭くなる。Sh 数分布について見ると(図 3)、開き角が大きくなると分岐部外壁部の低 Sh 領域が縮小する様子が分かる。しかしながら、動脈硬化好発部である ICA の Sinus 外壁部での Sh 数の値のレベルは、図 12 では判別しにくい、Case2 の場合では低下しており(図 13)、縮小された再循環領域でピンポイント的に酸素物質輸送能が低下する事が分かる。

3.3.3. まとめ 頸動脈分岐部の幾何形状因子が分岐部での酸素物質輸送機構に与える影響を調べるため、開き角と ICA:ECA 流量比をそれぞれ二通りに変化させ数値解析を行った。二通りの開き角については若年層(Case 1)と年配層(Case 2)の頸動脈分岐部の幾何形状を想定し、二通りの流量比については 58:42 を正常な場合、80:20 を ECA 下流部に狭窄、あるいは閉塞等の動脈硬化疾患を有する場合として想定した。本解析結果より、加齢と共に血行力学的な危険因子が頸動脈分岐部で増大することが予想される。

4. 研究成果

本研究では、生体の恒常性維持に関わる重要な指標の一つである血管内皮細胞の一酸化窒素(NO)産生能、ならびに細胞の酸素代謝能について、上記応力負荷に対する応答変化を調べ、生理学的環境下での力学的刺激と細胞機能異変との関連について明らかにすることを目的とし、血管内皮細胞、もしくは血管細胞、血管組織に関して、次の 3 項目

1. せん断応力刺激による NO 活性機構
2. 動脈壁内部の細胞での LDL 輸送機構
3. 頸動脈分岐部での酸素輸送機構

について調べた。1.については、内皮細胞が二系統のせん断応力刺激による産生機構を有することを予想し実験を行った。その結果、遺伝子レベルで調節が行われる NO 産生機構については、転写因子レベルでは活性が確認されたものの、蛋白レベルでは十分に確認できず、長時間の応力付加が必要であることが予想された。2.については、血管平滑筋細胞の LDL 代謝機構のせん断応力依存性について調べた。その結果、内皮細胞が持つ LDL 代謝機構のせん断応力依存性と同程度の機能が平滑筋細胞にも実現されると仮定した場合、そうでない場合に比べ、動脈組織内で

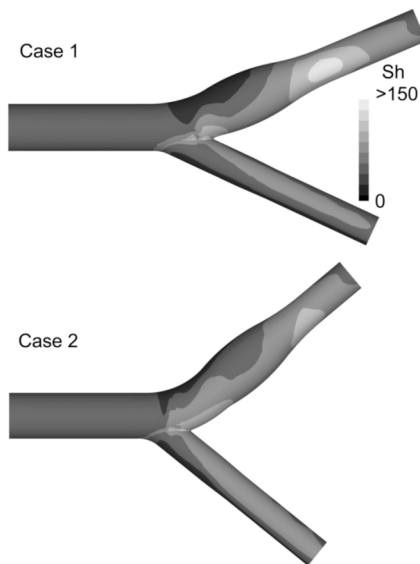


Fig. 12 Contours of the Sh distribution over the bifurcation wall at the flow ratio of ICA:ECA=58:42 for Case 1 and 2. 著しい LDL 代謝の増進が予想された. これ

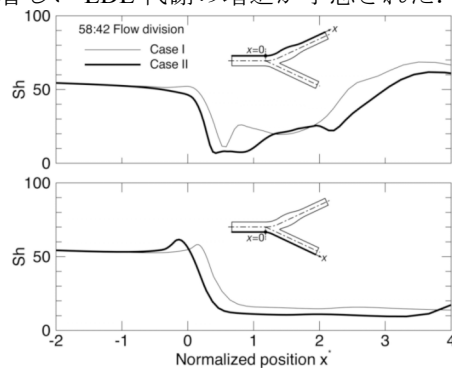


Fig. 13 Profiles of the Sherwood number along the outer wall of the CCA-ICA (top) and CCA-ECA (bottom) at the flow ratio of ICA:ECA=58:42 for Case 1 and 2.

は内皮細胞層での LDL 透過率によっても多大な影響を受けることが考えられる. 3.については, 若年層と老年層の頸動脈分岐部形状を模擬した動脈壁内部における酸素代謝のシミュレーションを行った. その結果, 加齢と共に血行力学的な危険因子(低酸素, 低せん断応力)が頸動脈分岐部で増大することが予想された. これは加齢と共に血管の形状や内皮細胞の状態が変化し, せん断応力刺激に対する細胞の機能応答が大きく変化するためであると考えられる.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Shigeru Tada, Numerical Study of Oxygen Transport in a Carotid Bifurcation, *Physics in Medicine and Biology*, 査読有, 55 巻, 2010, 3993-4010, DOI 10.1088/0031-9155/55/14/004
- ② 多田 茂, 頸動脈分岐部の幾何形状が動脈壁面酸素輸送に与える影響, *日本機械学会論文集(B編)*, 査読有, 76 巻, 2010, 2127-2133,

- ③ Shigeru Tada, Hirokazu Ozono, Computational study of LDL mass transport in the artery wall, *Journal of Bio rheology*, 査読有, 25 巻, 2011, 27-35, DOI 10.1007/s12573-011-0034-3

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田 茂 (TADA SHIGERU)
防衛大学校・応用科学群・教授
研究者番号: 70251650

(2) 研究分担者

工藤 奨 (KUDOH SUSUMU)
芝浦工業大学・工学部・教授
研究者番号: 70306926
一宮 浩一 (ICHIMIYA KOHICHI)
山梨大学・医学工学総合研究部・非常勤講師
研究者番号: 30037923
鳥山 孝司 (TORIYAMA KOHJI)
山梨大学・医学工学総合研究部・助教
研究者番号: 50313789