

平成22年6月4日現在

研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2007～2009
課題番号：19300157
研究課題名(和文) 組織・細胞の力学応答機構の統一的理解のための生体組織内力学場の微視的解析法の確立
研究課題名(英文) Establishment of microscopic analysis method of stress and strain fields in the biological tissues for unified understanding of mechanical adaptation mechanism from cells to tissues
研究代表者
松本 健郎 (MATSUMOTO TAKEO)
名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：30209639

研究成果の概要(和文)：生体組織は周囲の力学環境に応じて形態や力学特性を適応的に変化させる。この応答は組織内の細胞が自らに加わる力に応じて周辺組織を能動的に作り変えることにより生じる。このメカニズムを明らかにする第一歩として、組織のマクロな変形に伴い、細胞にどのような変形を生じるのか明らかにするとともに、組織内部に作用する微視的な力を計測する方法を確立した。ブタ胸大動脈壁を単純に引張った場合でも、細胞レベルでは剪断や回転変形が生じ、ミクロとマクロの変形は全く異なることが判った。また、組織内に採用する微視的な力は場所により2倍かそれ以上異なる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Biological tissues change their shape and mechanical properties adaptively in response to their mechanical environment. This response is caused by the cells in the tissue, which actively remodel the surrounding tissues in response to the force applied to them. As the first step to elucidate this mechanism, we have established a method to measure microscopic deformation of the cells during macroscopic tissue deformation and to estimate the force field in the tissue. It was found that 1) even a simple stretch of porcine thoracic aorta caused shear and rotation at a cellular level, i.e., microscopic deformation was completely different from macroscopic deformation; 2) microscopic stress caused by the stretch was not uniform and could vary by a factor of 2 or more depending on the locations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2008年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：医用生体工学・生体材料学

キーワード：バイオメカニクス、応力・ひずみ解析、細胞・組織、循環器・高血圧

1. 研究開始当初の背景

生体組織は自らに加わる力学刺激に応答し、適応的にその形態や力学特性を変化させる場合が多い。例えば血管壁は、高血圧に曝されると内径は変化せず壁厚が増加するが、この変化は壁内の円周方向応力を一定に保つよう起こると言われているし、ウサギの膝蓋腱(いわゆる“お皿”の下の腱でカッケの検査の時に叩く部分)に荷重が全くかからない状態にしておくとも引張強度は1週間で1/2, 3週間で1/10にまで低下する。

このような力学的適応の詳細を明らかにすることは、生理学的に興味深いばかりでなく、再生医工学において、血管や靭帯など荷重支持組織の再生を実現する上で重要である。なぜなら、膝蓋腱の例に示されるように、荷重支持組織がその力学的特性を維持し続けるためには、適度な力学負荷が加わっていることが必要不可欠であり、再生組織に生体組織に匹敵する荷重支持能力を付与するには力学刺激が必須と考えられるからである。そして、どの程度の大きさの、どのようなモードの負荷を、どのような時期に加えるかを明らかにすることが、荷重支持組織再生の実現に必要な不可欠であるといえる。

ところで、このような力学応答は組織内の細胞の能動的な応答の結果生じる。血管の組織培養でも力学環境に応じた適応的な変化を誘導できるが、細胞を死滅させると、このような応答は消滅する。従って、力学応答の詳細を明らかにするためには、組織内の細胞にどのような力がかかっているのか明らかにしなくてはならない。

ところが、従来の生体組織の応力解析は組織を均質と仮定して行われてきたものであり、この目的には役に立たない。なぜなら組織は細胞やコラーゲン、エラスチンなど、弾性係数が互いに数倍〜数100倍異なる構成要素が複雑に入り組んだものであるからである。このような不均質性を有する組織を体外に摘出し、無負荷状態においた場合、その組織内には複雑な残留応力分布が生じることになる。従って、生理的荷重が作用した組織内の応力分布を知るには、無負荷状態の試料内部の微視的残留応力分布を知ると共に、各構成要素の力学特性を計測する必要がある。

2. 研究の目的

生体軟組織内部の残留応力分布ならびに大変形領域までの力学特性を細胞レベルの分解能で計測する手法を確立して実際の組織内の生理状態における微視的応力・ひずみ分布を可能な限り詳しく明らかにすること

を目的とする。具体的には、申請者らがデータを多く有する大動脈壁を主な対象とし、血管壁内の組織に対応した残留応力分布と各要素の力学特性を求め、これらを基に組織内部の生理状態における応力分布を μm オーダーの分解能で明らかにする。

3. 研究の方法

試料には、まず我々が力学特性データを多く蓄積するブタ胸大動脈を用いる。試料をクライオトーム(生体試料を凍結下に厚さ $10\mu\text{m}$ 以下で切断する装置)で薄切した後、生体内を模擬した環境下でこれを生理状態の変形レベルまで引張り、この際の組織のミクロレベルの変形を顕微鏡で詳しく観察する。また、組織の微細部分をなるべくダメージ少なく切断するために、レーザマイクロダイセクション装置を試作する。本装置を使って、様々な状態まで引張った薄切試料に微小な切断を加え、切断部の広がり具合から試料に作用する力学場を推定する。このため、現有する細胞用引張試験機を用いて、組織を構成する平滑筋、弾性板、コラーゲンなどの力学特性を幅広い変形量域に互って計測する。これらのデータと別途計測してある血管全体の力学試験結果を組み合わせ、生理状態の血管壁内の細胞レベルの応力・ひずみ分布を調べる。これらの結果を通じて組織レベル、細胞レベルの力学応答を統一して議論できるフレームワークの構築を目指す。また、同様の手法を皮膚や脳組織、さらには細胞単体にも応用し、構成成分の不均質性と力学場更にそれに対する生体組織・細胞の応答について調べる。

4. 研究成果

(1)平成19年度：薄切試料切断用のレーザマイクロダイセクション装置を試作した(図1)。即ちUVパルスレーザを組織に照射することで、温度上昇を抑えつつ余計な外力を加えずに試料を切断できる装置を試作した。355nmのUVパルスレーザを繰返周波数30kHz、出力70mWで照射することで厚さ $100\mu\text{m}$ 程度までの組織を幅 $20\mu\text{m}$ 程度で、損傷少なく切断することが可能となった(図2)。ただし、特に厚い組織の場合に切断に伴う気泡の発生による組織の動揺が問題となることが判明し、今後、この問題を解決することが課題となった。

(2)平成20年度：主に薄切試料をマクロに変形させた際の試料内部のミクロな変形を観察した。すなわち、凍結マイクロトームによ

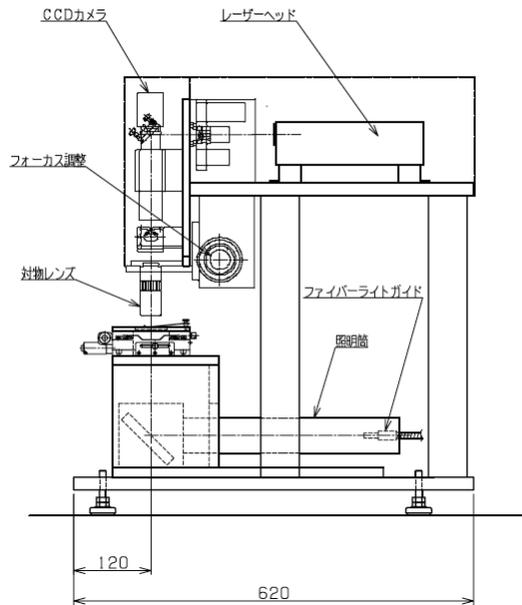


図1 レーザマイクロダイセクション装置

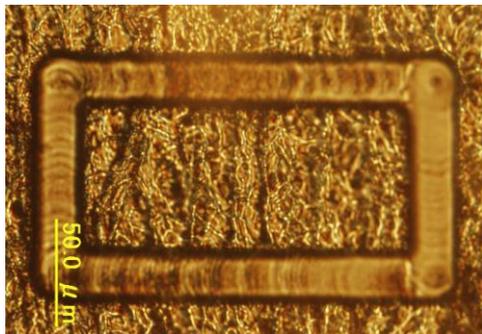


図2 血管薄切試料のレーザーによる切断

り血管円周方向を含むように厚さ数 $10\mu\text{m}$ に薄切したブタ胸大動脈試料を対象とし、内部の平滑筋細胞核を Hoechst 33342 で、弾性板をトリパンプルーで染色した後、顕微鏡下で組織を円周方向に引張り、マクロな変形に伴い内部の弾性板や細胞核がどのように運動するのかを調べた。その結果、マクロな伸長に伴い、血管壁内部では細胞の伸長だけでなく回転も発生すること、また、弾性板の伸張量には部位により3倍近い差がある可能性があることなどが明らかとなった(図3)。しかし、手動のマイクロマニピュレータを利用して引張を行ったために、観察部位を視野中心に保つことが困難であり、実験データの蓄積はまだ不十分であった。

(3)平成21年度：まず、顕微鏡ステージ上に設置可能な試料槽付き電動引張ステージを試作し、引張に伴う組織の変形を視野が大幅にずれることなく観察できるようにした(図4)。これを用いて引張に伴う薄切組織内の変形を詳しく調べたところ、1)弾性板は組織に加えられたマクロな伸長比が1.2程

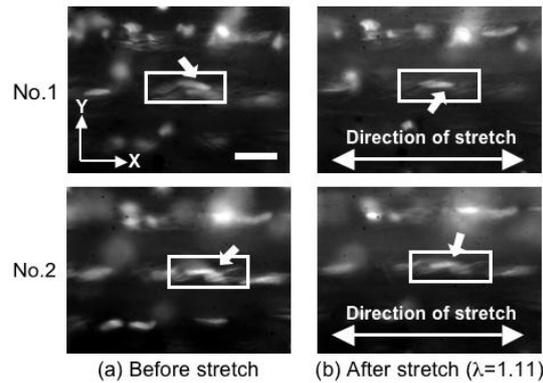


図3 血管薄切試料の引張に伴う内部変形

度でほぼ真っ直ぐになること、2)弾性板の蛇行に沿った長さの変化を局所毎に求めたところ、1本の弾性板内でも部位によってひずみに2倍以上の差があること、一方、平滑筋層については平滑筋細胞核の移動や変形の詳細な観察から、3)個々の平滑筋細胞が回転や剪断などの複雑な変形をしていること、4)同一の平滑筋層内でも引張に伴うひずみに2倍以上の差があること、などが明らかとなった。次にレーザーアブレーションによる組織の切断については、気泡が発生しても5分程度放置することで気泡が消滅することが判ったため、この方法で組織にレーザーをスポット照射して弾性板を切断した後の断端間距離の分布を調べた(図5)。無負荷状態でレーザー照射した場合と比べて、マクロな

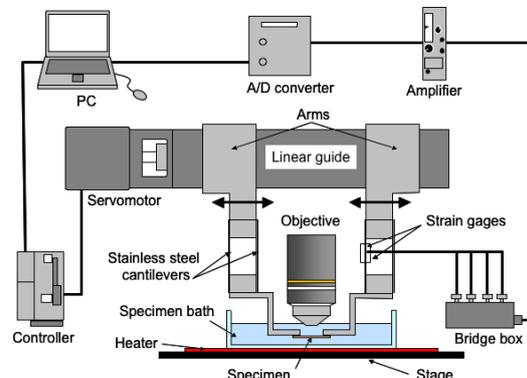


図4 試作した顕微鏡上引張試験装置

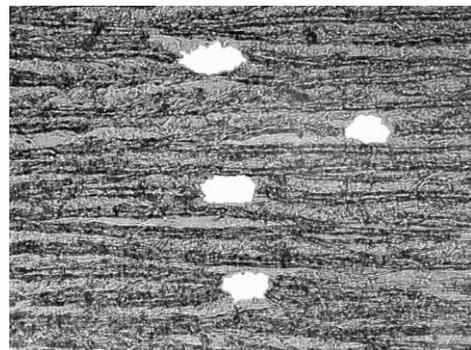


図5 血管薄片にレーザーで空けた孔の違い

伸長比が例えば $\lambda=1.4$ の場合、弾性板の断端同士の間隔は1.5-3倍になることが判った。この間隔は弾性板に作用する引張力と良く相関すると考えられるので、弾性板に加わる力にも2倍程度の差があると予想される。以上より、正常血管組織内の局所的な力学環境には部位により少なくとも2倍程度の差がある可能性が示唆された。

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10件)【特記したもの以外全て査読あり】

- ① Nagayama K, Matsumoto T: Estimation of Single Stress Fiber Stiffness in Cultured Aortic Smooth Muscle Cells under Relaxed and Contracted States: Its Relation to Dynamic Rearrangement of Stress Fibers, *J Biomech* 43, 1443-1449 (2010)
- ② Matsumoto T, Ikuta N, Mori M, Nagayama K: Mechanics of wrinkle formation: Micromechanical analysis of skin deformation during wrinkle formation in UV-irradiated mice, *Skin Res Technol* 16, 179-189 (2010)
- ③ Matsumoto T, Fukui T, Tanaka T, Ikuta N, Ohashi T, Kumagai K, Akimoto H, Tabayashi K, Sato M: Biaxial Tensile Properties of Thoracic Aortic Aneurysm Tissues, *J Biomech Sci & Engng* 4-4, 518-529 (2009)
- ④ Nagayama K, Morishima N, Matsumoto T: Effects of three-dimensional culture and cyclic stretch stimulation on expression of contractile proteins in freshly isolated rat aortic smooth muscle cells, *J Biomech Sci & Engng* 4-2, 286-297 (2009)
- ⑤ Nagayama K, Matsumoto T: Contribution of Actin Filaments and Microtubules to Quasi-in situ Tensile Properties and Internal Force Balance of Cultured Smooth Muscle Cells on a Substrate, *Am J Physiol Cell Physiol* 295-6, C1569-1578 (2008)
- ⑥ Matsumoto T, Fukunaga A, Narita K, Nagayama K: Microscopic Mechanical Analysis of Aortic Wall: Estimation of Stress in the Intramural Elastic Laminae and Smooth Muscle Cells in a Physiological State, *Proc 2008 Summer Bioeng Conf (CD-ROM)*, 192450.pdf (2008) (査読なし)
- ⑦ Tamura A, Hayashi S, Nagayama K, Matsumoto T: Variation in nerve fiber strain in brain tissue subjected to uniaxial stretch, *Stapp Car Crash J* 51, 139-154 (2007)
- ⑧ Matsumoto T, Fukunaga A, Narita K, Nagayama K: Mechanical analysis of the aortic wall considering microscopic heterogeneity, *Proc Int Conf Comput Biomech & Biol (ICCB)* 2007

(in CD-ROM) #311 (2007) (査読なし)

- ⑨ Nagayama K, Yanagihara S, Matsumoto T: Actin filaments affect on not only elasticity but also late viscous response in stress relaxation of single isolated aortic smooth muscle cells (Possible effect of active reorganization of actin filaments), *J Biomech Sci & Engng* 2-3, 93-104 (2007)
- ⑩ Nagayama K, Yanagihara S, Matsumoto T: A Novel Micro Tensile Tester with Feed-back Control for Viscoelastic Analysis of Single Isolated Smooth Muscle Cells, *Med Eng & Phys* 29-5, 620-8 (2007)

〔学会発表〕(計17件)

- ① 宇野洋平, 長山和亮, 松本健郎: 顕微鏡下観察型生体軟組織用引張試験機の開発と評価, 日本機械学会東海学生会第41回学生員卒業研究発表講演会(2010/3/8, 名古屋)
- ② 松本健郎: 力学的視点から眺めた血管とリモデリング, Fireside seminar「メカノストレスによる血管内皮機能障害と血管リモデリング」, 第74回日本循環器学会総会・学術集会(2010/3/5-7, 京都)【招待講演】
- ③ 松本健郎: 不均質性を考慮した血管組織内の微視的応力分布解析, 定量生物学の会第2回年会(2010/1/9-11, 大阪)【招待講演】
- ④ Matsumoto T, Fukunaga A, Narita K, Shirono T, Nagayama K: Microscopic heterogeneity in the mechanical environment of porcine thoracic aorta, 4th Asian-Pacific Conf on Biomech (2009/4/14-17, Christchurch, New Zealand)
- ⑤ 松本健郎: 組織・細胞内の微視的3次元応力分布可視化手法の確立, 基礎生物学研究所研究会「力学刺激と細胞応答」(2009/3/12, 岡崎)【招待講演】
- ⑥ 武澤健司, 長山和亮, 松本健郎: 動脈の内圧-直径関係に与える弾性板座屈の影響, 日本機械学会第21回バイオエンジニアリング講演会(2009/1/23-4, 札幌)
- ⑦ 松本健郎: 細胞・発生研究へのバイオメカニクス的アプローチ, 理研シンポジウム「細胞・発生研究への数理科学的アプローチ-先端研究から探るアクションプラン-」(2008/9/2-3, 神戸)【招待講演】
- ⑧ 城野貴洋, 長山和亮, 松本健郎: 新鮮ブタ胸大動脈薄切片の引張りに伴う壁内構成要素の変形挙動の観察, 日本機械学会2008年度年次大会(2008/8/4-6, 横浜)
- ⑨ Matsumoto T, Fukunaga A, Narita K, Nagayama K: Microscopic Mechanical Analysis of Aortic Wall: Estimation of Stress in the Intramural Elastic Laminae and Smooth Muscle Cells in a Physiological State, 2008 Summer Bioeng Conf (6/25-29/08, Marco Island, FL, USA)
- ⑩ 松本健郎: 力学刺激に対する細胞応答のバ

イオメカニクスの解析：生体組織の力学的適応反応の解明に向けて，基礎生物学研究所研究会「細胞外刺激と細胞応答」(2007/12/20-1, 岡崎) 【招待講演】

⑪松本健郎，福永晃久，成田健吾，長山和亮：
ブタ胸大動脈壁内弾性板・平滑筋に生理状態で作用する力の推定，第20回バイオエンジニアリング講演会(2008/1/25-6, 東京)

⑫Matsumoto T: Blood vessel wall as composite materials: Mechanical analysis of aortic walls considering microscopic structure, Int & INCCOM-6 Conf on Future Trends in Composite Materials & Processing (2007/12/12-14, Kanpur, India) 【Invited lecture】

⑬ Matsumoto T: Effects of cytoskeletal structures on elastic and viscoelastic properties of cells in soft tissues, Symp on Biomech at Micro- and Nanoscale Levels (2007/11/9, Tokyo, Japan)

⑭Matsumoto T, Ogawa M, Wake F, Nagayama K, Ishino Y: Three Dimensional Observation of Cellular Microstructures with a Novel Fluorescent Optical Tomography, 3rd Asian-Pacific Conf on Biomech (2007/11/5-8, Tokyo, Japan)

⑮大岡 誠，長山和亮，松本健郎：生理的変形状態に置かれた血管壁内ひずみの半径方向分布に対する平滑筋収縮の影響の計測，日本機械学会第18回バイオフロンティア講演会(2007/10/6-7, 福岡)

⑯ Matsumoto T, Fukunaga A, Narita K, Nagayama K, Yoshimura A: Mechanical analysis of the aortic wall considering microscopic heterogeneity, The 1st IMACS (Int Assoc for Math & Comp in Simulation) Int Conf on Comput Biomech & Biol (ICBB 2007) (2007/9/10-14, Pilsen, Czech Republic) 【Invited lecture】

⑰松本健郎：大動脈壁内平滑筋細胞のバイオメカニクス，第49回日本平滑筋学会総会(2007/7/5-6, 橿原市)

〔図書〕(計1件)

①Matsumoto T, Nagayama K, Miyazaki H, Ujihara Y: Effects of cytoskeletal structures on elastic and viscoelastic properties of cells in soft tissues, Biomechanics at Micro- and Nanoscale Levels, Volume IV, World Scientific, Singapore, 14-24 (2007)

〔産業財産権〕

○出願状況(計4件)

名称：Biological Luminal Body Evaluating Apparatus
発明者：Matsumoto T, Nagayama K, Takezawa K, Masuda H
権利者：同上
種類：特許権

番号：12/071873

出願年月日：2008年2月27日出願

国内外の別：国外(米国)

名称：細胞把持・回転観察装置

発明者：松本健郎，大原大典，長山和亮

権利者：同上

種類：特許権

番号：2008-043987

出願年月日：2008年2月26日出願

国内外の別：国内

名称：生体内管腔体評価装置

発明者：塚原弘政，加藤義人，松本健郎，益田博之

権利者：同上

種類：特許権

番号：2009-057133

出願年月日：2009年3月10日出願

国内外の別：国内

名称：軟試料弾性率の深さ方向分布計測装置

発明者：松本健郎，宮野真一，長山和亮

権利者：同上

種類：特許権

番号：2009-254316

出願年月日：2009年11月5日出願

国内外の別：国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://biomech.web.nitech.ac.jp/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 健郎 (MATSUMOTO TAKEO)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：30209639

(2) 研究分担者

長山 和亮 (NAGAYAMA KAZUAKI)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号：10359763

(3) 連携研究者

該当なし