

## 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 25 年 6 月 4 日現在

機関番号：12601  
 研究種目：基盤研究(B)  
 研究期間：2010 ～ 2012  
 課題番号：22360082  
 研究課題名(和文) 疑似血管デバイスを用いた内皮細胞にかかるせん断応力の計測と細胞の応答の計測  
 研究課題名(英文) Experimental Investigation of Response of Endothelial Cells and Measurement of Fluid Shear Stress Using Blood Vessel Model  
 研究代表者  
 杉井 康彦 (SUGII YASUHIKO)  
 東京大学・大学院工学系研究科・特任准教授  
 研究者番号：90345108

### 研究成果の概要 (和文)：

動脈硬化や脳梗塞、心筋梗塞などと言った循環器系疾患の原因解明のために、血管の表面の細胞である内皮細胞を、マイクロ流路内でせん断応力を負荷しながら培養する方法を検討し、培養方法を確立した。高速共焦点マイクロ PIV システムを用いて被写界深度を浅くすることにより空間分解能を大幅に向上させ、細胞表面近傍の速度分布を求める計測法を開発した。また、蛍光粒子画像から細胞の 3 次元形状を推定する手法を開発し、速度分布との比較を行った。

### 研究成果の概要 (英文)：

To investigate an influence of a glycocalyx surface layer covering over endothelial cells (ECs) on the flow field or flow through the layer, a high spatial resolution measurement technique was improved for three-dimensional velocity distributions close to a glycocalyx layer by utilizing a confocal micro-PIV (Particle Image Velocimetry) technique. The developed technique achieved to measure three-dimensional velocity distributions in a  $177 \times 177 \times 3 \mu\text{m}^3$  region with in-plane resolution of  $7 \mu\text{m}$  and with depth resolution of  $0.5 \mu\text{m}$ . By optimizing the PIV analysis, the measurement accuracy was improved even with small fluorescent particle of the diameter of  $200 \text{ nm}$  and large shear rate. Three-dimensional velocity distribution close to the layer of living ECs cultured in microchannel was measured. The results suggested that the developed technique was useful for investigation of velocity field close to the layer.

### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2011 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2012 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学・流体工学

キーワード：バイオ流体力学, マイクロ流体, 血管内皮細胞, せん断応力, 循環器病

#### 1. 研究開始当初の背景

現代社会において、心臓病・高血圧症・脳血管障害などに代表される循環器系疾患による我が国の死亡率が国民死亡原因の約 30% となっており、これらの疾病対策は国家

的課題となっている。循環器系の疾患の原因の 1 つとして、内分泌器官、免疫系および内臓実質臓器などの異常による血液のレオロジの変化が考えられており、特に微小循環は、栄養の供給や老廃物の排出にとって非常に

重要であり、血管径も細いため梗塞や狭窄が起りやすい。そのため、循環器系疾患の予防および原因解明に必要な生体内の微小循環における血流と細胞の応答の関係の把握が望まれている。

これまでに、血管の表面の細胞である内皮細胞が流れによるせん断応力に反応して、流れ方向に配向し、長細く変形する事や、せん断応力と内皮細胞における NO などの産生量と関係があるなどが報告されている。高血圧症患者において動脈内皮細胞による NO 産生量が減少していることが報告されており、内皮細胞の機能障害が高血圧症の病態進行に重要な要因であると考えられている。また、内皮細胞の低比重リポタン (LDL) などの透過性は、血流によるせん断応力によって変化することが報告されており、この原因として、せん断応力の増大によって内皮細胞の収縮が起こり、細胞間隙が広がることが考えられている。これらの研究は主に生体外実験が用いられ、細胞が密な状態になってこれ以上増殖しない状態であるコンフルエントになってから、せん断応力が負荷されている。一方、計測した内皮細胞の形状をもとに数値計算法を行って細胞にかかるせん断応力の分布を求め、細胞の変形によって壁面せん断応力の勾配が小さくなっていることが示されている。

上述のように流れによるせん断応力と細胞の形態変化や NO の産生などとの相関が指摘されているが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。その原因の一つとして、細胞にかかるせん断応力や産生した物質の計測の空間分解能や計測精度が不十分なことがある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、動脈硬化や脳梗塞、心筋梗塞などと言った循環器系疾患の原因解明のために、疑似血管デバイスを用いて、内皮細胞と流れによる刺激との関係を詳細に調べることである。せん断応力を負荷しながら培養を行い、血流による内皮細胞にかかるせん断応力の分布や細胞の3次元形状を高い空間分解能で計測し、せん断応力による内皮細胞の配向や遊走などの形態変化との関係を調べる。

## 3. 研究の方法

### (1) 高分解能速度分布計測法の開発

高速共焦点マイクロ PIV システムを用いて、被写界深度を浅くすることにより空間分解能を大幅に向上させ、細胞表面近傍の速度分布を求める計測法を開発した。40 倍の油浸対物レンズ (Plan Fluor; Nikon, NA = 1.3) を取り付けした倒立顕微鏡 (Ti-U; Nikon) に共焦点スキャナ (CSU-X1; 横河電機)、波長 488

nm の CW レーザ (SAPPHIRE; Coherent)、I. I. 付高速度カメラ (SV-200i; Photron, 512×512 pixel, 10bit) を接続した。撮像領域は 177×177  $\mu\text{m}$  である。高空間分解能と高計測精度を両立させるため、光学系の最適化を行うとともに、粒径 200 nm、密度 1.05 g/cm<sup>3</sup> のポリスチレン蛍光粒子 (励起波長: 505 nm, 蛍光波長: 515 nm) を用いた。本システムの被写界深度は理論的に 0.58  $\mu\text{m}$  と非常に薄くなった。細胞の上方の Z=13-15.5  $\mu\text{m}$  の領域を 0.5  $\mu\text{m}$  毎に 6 断面を計測した。計測誤差の原因となる長い流跡線为了避免するため、流速と比較して十分に高いフレームレートである 1000 fps で撮像し、得られた時系列の画像から最適なイメージペアを選択する方法を開発した。検査領域を 40×40 pixel、オーバーラップ率を 50% とし、直接相互相関法を用いて速度分布を求めた。さらに、ブラウン運動の影響を除去するために、200 枚の速度分布の時間平均を行った。

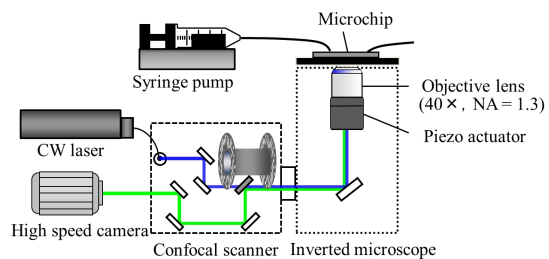


図 1. 高分解能速度分布計測システム

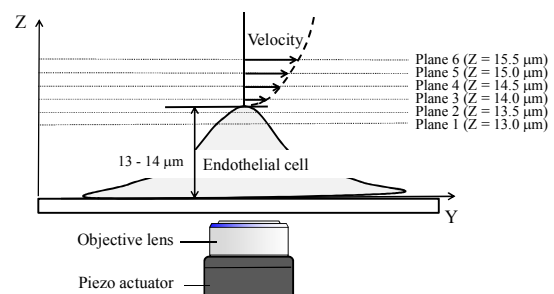


図 2. 血管内皮細胞周りの速度分布計測領域

### (2) マイクロ流路内での細胞培養

幅 400  $\mu\text{m}$ 、深さ 120  $\mu\text{m}$ 、長さ 20 mm の PDMS (polydimethylsiloxane) 製直線流路内に 1.0 mg/ml のマトリゲルを導入し、温度 37.0  $^{\circ}\text{C}$ 、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベータ内で 1 時間静置して壁面修飾をした。コーティング後、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVECs) を  $1.0 \times 10^6$  cells/ml の濃度で精度検証に用いたものと同じ形状のマイクロ流路内に導入し、インキュベータ内で 2 時間静置した。40~50  $\mu\text{m}$  程度の大きさの内皮細胞が確認され、その形状は、円形および楕円形となった。

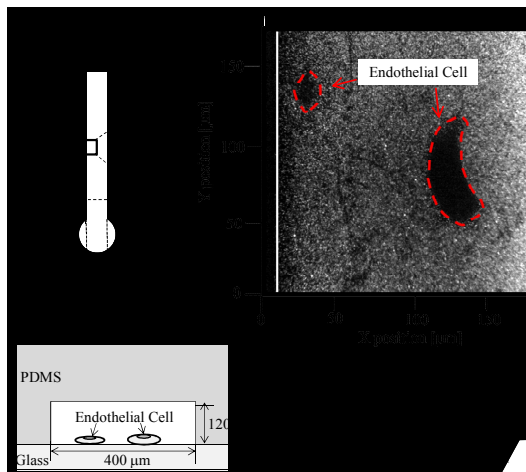


図 3. マイクロ流路内の血管内皮細胞周りの粒子画像

#### 4. 研究成果

本研究では、光学系にピンホールを組み込むことで焦点面のみの画像を取得できる共焦点マイクロPIVシステムを用いて、マイクロ流路内の血管内皮細胞表面近傍の流動場を計測する手法を開発した。深さ方向に500nmと非常に高い空間分解能の速度分布計測が可能となった。本手法を細胞がない状態の幅400μm、高さ120μmのPDMS製マイクロ流路内の流れ場に適用し、精度評価を行った。開発した手法を用いて、マイクロ流路内で培養した血管内皮細胞の表面近傍の流動場を本手法により計測した。細胞による速度の変化を捉える事ができた。さらに、得られた蛍光粒子画像を用いて、細胞の表面形状を三次元的に再構築する手法を開発し、細胞の3次元形状を求めた。

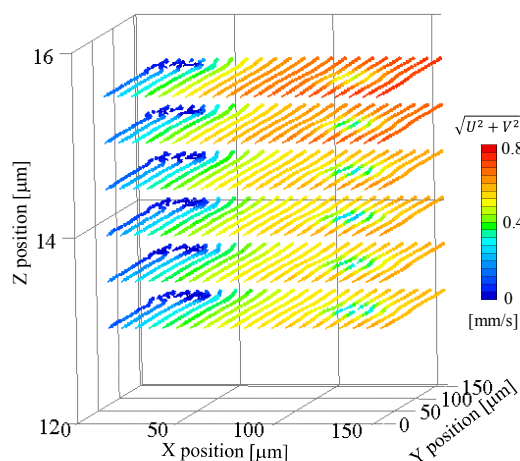


図 4. 血管内皮細胞近傍の速度分布

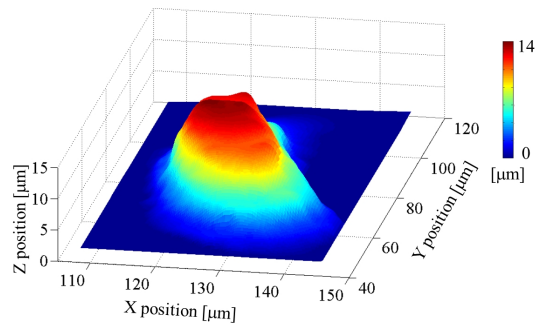


図 5. 血管内皮細胞の形状

#### 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 8 件)

(1) T. Mukoyama, Y. Sugii, K. Hishida, High resolution measurement technique for near surface velocity distribution and surface topography of endothelial cells using confocal micro-PIV, Proc. 16th Int. Symp. Applications of Laser Techniques to Fluid Mechanics, Lisbon, Portugal, 2012. 査読有

(2) Aota A, Takahashi S, Mawatari K, Tanaka Y, Sugii Y, Kitamori T, Microchip-based Plasma Separation from Whole Blood via Axial Migration of Blood Cells, Analytical Sciences, 27(12), 1173, 2011. 査読有

(3) Gao X, Tanaka Y, Sugii Y, Mawatari K and Kitamori T, Basic Structure and Cell Culture Condition of a Bioartificial Renal Tubule on Chip Towards a Cell based Separation Microdevice, Anal. Sci., 27(9), 907-912, 2011. 査読有

(4) Tanaka Y, Akaike H, Sugii Y, Kitamori T, Establishment of a confluent cardiomyocyte culture in a cylindrical microchannel, Anal. Sci., 27(9), 957-960, 2011. 査読有

(5) Sugii Y, Simultaneous Measurement of Wall Shear Stress Distribution and Three-Dimensional Shape of Living Endothelial Cells Cultured in Microchannel, Journal of Biomechanical Science and Engineering, 5, 625-634, 2010. 査読有

(6) T. Yamashita, Y. Tanaka, Y. Sugii, K. Mawatari, T. Kitamori, CONSTRUCTION OF

VASCULAR-MIMETIC TISSUE IN A SEPARABLE MICROCHIP, The 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences ( $\mu$ TAS2010), Groningen, Netherlands, 2010. 査読有

(7) Sugii Y, Shear Stress Measurement of Endothelial Cells Cultured in Microchannel Using Micro PIV Technique, Micro/Nano Flow Measurement Techniques, Tokyo, 2010. 査読有

(8) Sugii Y, MEASUREMENT OF SHEAR STRESS AND THREE DIMENSIONAL SHAPE OF ENDOTHELIAL CELLS CULTURED IN MICROCHANNEL, 14th International Symposium on Flow Visualization, Daegu, Korea, 2010. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

(1) 向山 卓哉, 杉井 康彦, 菱田 公一, 共焦点マイクロPIVによる血管内皮細胞近傍の高分解能速度分布および細胞形状計測, 第49回日本伝熱シンポジウム, 2012.

(2) 向山 卓哉, 杉井 康彦, 菱田 公一, 共焦点マイクロPIV法によるマイクロ流路内の血管内皮細胞にかかるせん断応力分布と形状の時間的变化, 日本機械学会第24回バイオエンジニアリング講演会, 2012.

(3) 山下 忠紘, 田中 陽, 杉井 康彦, 馬渡 和真, 北森 武彦, マイクロ流路における血管組織構築のための平滑筋細胞と内皮細胞の共培養, 第23回化学とマイクロ・ナノシステム研究会, 2011.

(4) 山下 忠紘, 田中 陽, 杉井 康彦, 馬渡 和真, 北森 武彦, 分離型マイクロ化学チップ内での血管平滑筋細胞の培養条件の検討, 第21回化学とマイクロ・ナノシステム研究会(CHEMINAS), 2010.

〔図書〕(計0件)

無し

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

無し

○取得状況(計0件)

無し

〔その他〕

ホームページ等

無し

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉井 康彦 (SUGII YASUHIKO)

東京大学・大学院工学系研究科・特任准教授

研究者番号: 90345108

### (2) 研究分担者

菱田 公一 (HISHIDA KOICHI)

慶應義塾大学・理工学部・教授

研究者番号: 40156592

### (3) 連携研究者

無し