

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：13903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26560257

研究課題名(和文) 血圧測定による内皮機能低下現象の解明と新たな動脈硬化診断法への応用

研究課題名(英文) Study on temporal deterioration of endothelial cell functional following blood pressure measurement and its application to novel diagnosis of atherosclerosis

研究代表者

松本 健郎 (Matsumoto, Takeo)

名古屋工業大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30209639

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：血圧測定時の上腕動脈の圧平により血管内皮機能が低下することを見出した。市販の血圧計で血圧測定しつつ内皮機能をFMD法で評価したところ、5回連続計測するとFMD値が有意に低下した。また、収縮期血圧+50mmHgの圧をカフに加え10秒間圧平する操作を3回繰り返しても同様に低下したことから、FMDの低下は血管内腔面同士が強く密着させられることで生じる可能性が示された。また、家兔総頸動脈でFMD再現系を確立した。圧平によりFMDが低下した血管では内皮細胞密度減少、糖鎖体積も減少している傾向が確認できた。

研究成果の概要(英文)：We have found that occlusion of the brachial artery decreases endothelial function. Endothelial cell function evaluated with FMD measurement decreased significantly after blood pressure measurement for 5 times with a commercially available blood-pressure gauge. FMD value also decreased after the brachial artery had been occluded for 3 times by pressurizing the blood-pressure cuff at systolic pressure + 50 mmHg for 10 s. These results suggest that the decrease in FMD value is caused by strong pressing of the luminal surface of the artery to each other. We have successfully induced FMD in the rabbit carotid artery, and found that the density of the endothelial cells as well as the volume of sugar chain on the cells decreased in the pressurized arteries whose FMD response had been decreased.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：動脈硬化 血管内皮細胞 血管平滑筋細胞 FMD

1. 研究開始当初の背景

通常の血圧計測(聴診法)では、腕を加圧して上腕動脈を圧平した後、徐々に減圧した際に発生するコロトコフ音を利用する。コロトコフ音発生時には血管壁の内面同士が衝突を繰り返す中、血流が高速の乱流となって断続的に流れている。このような環境では血管内皮細胞が何らかのダメージを受ける可能性がある。しかし、このような観点からの研究は調べた範囲では見つからない。そこで我々は実際に血圧測定後の上腕動脈で FMD 検査を行い、血圧測定後は血管内皮機能(FMD 値)が実際に低下する結果を得た。一方、我々が開発を進める平滑筋機能検査(PMC 検査)で計測した平滑筋機能には有意な低下は見られず、動脈の圧平が内皮細胞に直接的に何らかのダメージをもたらしている可能性が高い。次に低下した内皮機能の回復過程を調べた結果、FMD 値の回復は若年者より中高年で遅かった。これは内皮機能の回復能が加齢と共に低下することを意味し、内皮の機能回復能を動脈硬化性疾患発生リスクの指標とする可能性に思い至った。

2. 研究の目的

本研究では、血圧測定後の内皮機能低下現象の解明と、その後の内皮機能回復過程の動脈硬化診断への応用を目的とする。具体的には、ヒト上腕動脈を対象とし、血圧測定前後での内皮・平滑筋の機能変化データを蓄積し、この現象の普遍性を確かめる。また、どのような状況でこのような現象が生じるのか、定量的に明らかにする。更に、この現象の原因を探るため、血管圧平が内皮・平滑筋細胞に及ぼす影響を、開発しつつある家兎総頸動脈の in situ 評価系で調べる。

3. 研究の方法

血圧計測時の圧平が血管壁に与える影響を調べるために、1) ヒト上腕動脈を対象とし、様々な年齢・性別の被検者について、内皮機能の指標として FMD 値、平滑筋機能の指標として PMC 値を血圧測定の前で計測する。特に血管圧平による内皮機能の低下がどのような条件で生じるのか明らかにする。次に、2) 内皮機能低下の原因を探るため、動物の動脈を対象に、圧平により FMD 値の低下した血管を摘出し、内皮細胞の剥離の有無や内皮表面の糖鎖の量、表面の膜タンパクの分布様態などを調べ、内皮機能低下との関連を探る。

1) 血管圧平後の血管機能変化の計測

ヒト上腕動脈を対象とし、様々な年齢・性別の被検者について、現有する FMD/PMC 計測装置を用い、内皮機能の指標として FMD 値、平滑筋機能の指標として PMC 値を計測する。血圧測定前後での変化を調べ、血管圧平により内皮機能と平滑筋機能がどの程度変化するのか、明らかにする。即ち、上腕に FMD/PMC 計測装置の密閉容器を装着し、末梢の前腕部

をカフで5分間駆血し、血流を再開した後の上腕動脈の径拡張量を測定する(FMD 計測)。次に密閉容器内に陰圧をステップ状に負荷して上腕動脈を拡張させた後、上腕動脈の径収縮量を計測する(PMC 計測)。この後、一旦、密閉容器を取り外し、上腕部にカフを巻いて血圧を数回測定する。その後、再び、容器を装着して FMD 計測と PMC 計測を行う。以上より、血管圧平前後での FMD 値、PMC 値の変化を比較する。特に、血圧測定回数やコロトコフ音が発生している時間を変化させ、どのような条件で FMD 値に変化が生じるのか明らかにすることを中心に進める。

2) 血管圧平後の血管機能変化原因の検討

予備検討からこの実験に有効であることを見出している家兎総頸動脈を対象に、血管圧平が内皮機能に及ぼす影響を in situ で調べた後、血管を摘出し、圧平が血管内皮細胞に与える影響を調べる。すなわち、麻酔下に皮膚を切開して総頸動脈を露出させ、直径を光学的にモニタしつつ、末梢側を5分間駆血後再灌流して、FMD 応答を調べる。この際、剥離により血管作働性神経の支配が断たれ、血管径が拡張してしまうことが判明したため、血管周囲を37℃の希薄ノルアドレナリン溶液で満たしておく。次に直径計測部位の血管をカフで圧平し、再び FMD 応答を観察する。FMD 応答が減弱するのであれば、内皮細胞が剥離、あるいは流れを察知できなくなった可能性が考えられる。そこで、内皮細胞の剥離の有無、また、内皮細胞が流れを察知するのに必須と言われている細胞表面の糖鎖の剥離状況、糖鎖が結合している種々の膜表面タンパクの存在状況等を調べる。また、細胞間接着が失われると流れに応答しなくなること知られているので、VE カドヘリンなど細胞間結合タンパクについても違いがないか調べる。内皮細胞の剥離状況は血管壁へのエバンスブルーの取り込み(内皮細胞が剥離したところは壁が青染される)や走査型電子顕微鏡で調べる。糖鎖の剥離状況はアルシアンブルー染色やヘパラン硫酸抗体による染色などで評価する。タンパクの分布や量は、免疫蛍光染色により評価する。

4. 研究成果

まず、ヒト上腕動脈に関して、現有する FMD/PMC 計測装置を用い、内皮機能の指標として FMD 値、平滑筋機能の指標として PMC 値を、血圧測定による血管圧平の前で計測した。具体的には、まず、FMD 計測として、上腕に FMD/PMC 計測用密閉容器を装着してから前腕部をカフで5分間駆血、血流を再開した後の上腕動脈の径拡張量を測定した。次に PMC 計測として、容器内に陰圧をステップ状に負荷して上腕動脈を拡張させた後、上腕動脈の径収縮量を計測した。この後、一旦、容器を取り外し、市販の血圧計で血圧を1, 3, または5回計測した。その後、再び、容器を

装着して FMD 計測と PMC 計測を行った。その結果、血圧を 1 または 3 回計測しても FMD 値、PMC 値ともに有意な変化は現れなかったが、5 回連続で計測すると FMD 値が有意に低下した。これより通常の血圧測定を 5 回繰り返すと内皮機能が低下する可能性が示された。家兎総頸動脈を用いた in situ の FMD 再現系の確立については、血管周囲を希薄ノルアドレナリン添加生理食塩水で満たし、温度を 37 に保つことで、FMD 現象を生じさせることが 1/2 程度の確率でできるようになった。しかし、FMD 応答が出現しない場合もあり、原因を探る必要がある。また、血管圧平後に FMD が低下する傾向も確認することができた。FMD が低下した総頸動脈の内面を SEM 観察したところ、内皮細胞が剥がれ、細胞密度が低下していること、細胞形態が丸くなっていることなどを確かめた。

次に、カフによる血管圧平後の FMD の低下が、カフ圧波形のどの部分により生じるのかわかるようにするために、血管を収縮期血圧 + 50mmHg で 10 秒間圧平後、収縮期血圧と拡張期血圧の中間の圧力で 10 心拍分保つ操作を 3 回行ったところ、FMD は有意に低下した。次に、収縮期血圧 + 50mmHg で 10 秒間圧平するだけの操作を 3 回、また、収縮期血圧と拡張期血圧の中間の圧力で 10 心拍分保つだけ操作を 3 回繰り返したところ、前者では FMD が有意に低下したものの、後者では FMD の低下は見られなかった。このことより、FMD の低下は、当初予想したように血管内腔面同士の間で衝突し衝突に原因があるというよりは、血管内腔面同士が強く密着させられることによる可能性が明らかとなった。次に、血管圧平後の FMD の低下がどのくらいの時間スケールで回復するのか、調べたところ、回復速度と年齢との間に有意な負の相関が見られた。内皮細胞の機能回復力は年齢とともに低下する可能性が示された。家兎総頸動脈による in situ の FMD 再現系の確立については、FMD の出現割合に変化は見られなかったが、血管圧平後に FMD が低下した血管において、正常血管と比べて糖鎖体積が減少している傾向が確認できた。一方、糖鎖密度に関してはそのような変化は見られなかった。昨年得られた、FMD 低下血管における細胞密度の低下と考えあわせると、圧平による FMD の低下現象は、内皮細胞の剥離と内皮細胞上の糖鎖層の厚みの減少の両方の要因により発生している可能性が示された。

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 5 件)

Nagayama K, Yamazaki S, Yahiro Y, Matsumoto T: Estimation of the mechanical connection between apical stress fibers and the nucleus in vascular smooth muscle cells

cultured on a substrate, J Biomechanics 47-6, 1422-1429 (2014) DOI:

10.1016/j.jbiomech.2014.01.042

Nagayama K, Saito S, Matsumoto T: Multiphasic Stress Relaxation Response of Freshly Isolated and Cultured Vascular Smooth Muscle Cells Measured by Quasi-In Situ Tensile Test, Bio-Medical Materials and Engineering 25-3, 299-312 (2015) doi: 10.3233/BME-151276

Nagayama K, Hamaji Y, Sato Y, Matsumoto T: Mechanical trapping of the nucleus on micropillared surfaces inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells but not cervical cancer HeLa cells, J Biomechanics 48-10, 1796-1803 (2015) doi: 10.1016/j.jbiomech.2015.05.004

王 軍鋒, 杉田修啓, 長山和亮, 松本健郎: 細胞の基板接着・伸展過程における焦点接着斑の形態変化の解析, 日本生体医工学会誌 53-6, 311-318 (2015) DOI:10.11239/jsmbe.53.311

Wang JF, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto T: Dynamics of actin filaments of MC3T3-E1 cells during adhesion process to substrate, Journal of Biomechanical Science and Engineering 11-1, 15-00637 (2016) doi: 10.1299/jbse.15-00637

[学会発表](計 20 件)

Matsumoto T, Uno Y, Iijima S, Nakamura S, Yokota H, Nagayama K: Mechanical Analysis of Aortic Walls Considering Heterogeneity at a Cellular Level, The Seventh World Congress of Biomechanics (2014/7/, Boston, MA, USA)

Matsumoto T, Uno Y, Iijima S, Sugita S, Nagayama K: On Heterogeneity of the Mechanical Environment in the Aortic wall: Relation between Waviness of Elastic Lamina and Protein Expression, The Fourth Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (2014/9/1-4, Shima, Japan)

【Invited speaker】

Matsumoto T: On heterogeneity of mechanical environment of vascular walls at a cellular level, Human Biomechanics 2014 (2014/9/15-16, Pilsen, Czech Republic)

【Plenary lecturer】

矢口俊之, 長山和亮, 塚原弘政, 益田博之, 松本健郎: 経壁圧操作によるヒト上腕動脈の圧-径関係とステイフネスの非侵襲計測, 第 53 回日本生体医工学会大会 (2014/6/24-26, 仙台)

Yaguchi T, Nagayama K, Tsukahara H, Masuda H, Matsumoto T: Non-invasive measurement of pressure-diameter relationship and smooth muscle contractility of human brachial arteries through transmural pressure manipulation, 7th World Congress of

Biomechanics (2014/7/6-11, Boston, MA, USA)

Yaguchi T, Sugita S, Nagayama K, Tsukahara H, Masuda H, Matsumoto T: Non-invasive measurement of pressure-diameter relationship of human brachial artery through transmural pressure manipulation, The fourth Japan-Switzerland Workshop on Biomechanics (2014/9/1-4, Shima, Japan)

矢口俊之, 長山和亮, 杉田修啓, 塚原弘政, 益田博之, 松本健郎: 経壁圧操作によるヒト上腕動脈の平滑筋機能と圧-径関係の計測, 生活生命支援医療福祉工学系学会連合大会 2014 (LIFE2014), (2014/9/24-6, ルスツリゾート, 北海道)

矢口俊之, 狩野雅史, 杉田修啓, 長山和亮, 益田博之, 松本健郎: 心電図同期チョッパ圧負荷によるヒト上腕動脈平滑筋運動能の評価, 日本機械学会第 25 回バイオフロンティア講演会 (2014/10/3-4, 鳥取)

矢口俊之, 狩野雅史, 杉田修啓, 長山和亮, 益田博之, 松本健郎: ヒト上腕動脈平滑筋運動能の評価に向けた心電図同期によるチョッパ圧負荷法の開発, 平成 26 年度日本生体医工学会東海支部学術集会 (2014/10/18, 名古屋)

河口磨紀, 矢口俊之, 杉田修啓, 長山和亮, 安達栄治郎, 松本健郎: 家兎総頸動脈におけるリアルタイム FMD 計測法の確立と血管圧平の影響の解析, 日本機械学会第 27 回バイオエンジニアリング講演会 (2015/1/9-10, 新潟)

河原純哉, 矢口俊之, 杉田修啓, 松本健郎: 血圧測定後の血管内皮機能低下因子の解明に関する基礎研究, 日本機械学会東海支部第 46 回学生員卒業研究発表講演会 (2015/3/12, 春日井)

Matsumoto T: Mechanical heterogeneity in the aortic wall: from macroscopic to microscopic viewpoint, Joint meeting of 15th International Congress of Biorheology and 8th International Conference on Clinical Hemorheology (2015/5/24-28, Seoul, Korea) 【Plenary Lecture】

Matsumoto T, Uno Y, Iijima S, Moriyama Y, Sugita S, Nagayama K, Matsumoto A: Microscopic heterogeneity in the aortic wall: Correlation between mechanical environment and protein expression, Summer Biomechanics, Bioengineering and Biotransport Conference (2015/6/17-20, Snowbird, UT, USA)

松本健郎: 動脈硬化血管の力学特性-本当に「硬化」しているのか?, 第 47 回日本動脈硬化学会学術集会 (2015/7/10, 仙台) 【Invited symposiast】

Matsumoto T, Sugita S, Shirono T, Iijima S, Nagayama K, Matsumoto A: Dorsal-ventral difference in biomechanical and biochemical properties in the rabbit thoracic aortas, 25th

Congress of the International Society of Biomechanics (2015/7/12-16, Glasgow, UK)

Matsumoto T, Uno Y, Sugita S, Nagayama K: Heterogeneity in the mechanical environment of elastic laminas in porcine thoracic aortas, International Conference on Advanced Technology in Experimental Mechanics (ATEM'15) (2015/10/4-8, Toyohashi, Japan)

窪田健人, 狩野雅史, 矢口俊之, 杉田修啓, 益田博之, 松本健郎: 心電図同期チョッパ圧負荷法によるヒト上腕動脈の平滑筋機能の非侵襲計測に関する研究, 第 54 回日本生体医工学会大会 (2015/5/7-9, 名古屋)

矢口俊之, 河口磨紀, 杉田修啓, 長山和亮, 安達栄治郎, 松本健郎: 家兎総頸動脈における in situ FMD 再現系の構築, 第 54 回日本生体医工学会大会 (2015/5/7-9, 名古屋)

窪田健人, 狩野雅史, 矢口俊之, 宮城英毅, 杉田修啓, 益田博之, 松本健郎: ヒト上腕動脈における平滑筋機能の非侵襲計測を目指した心電図同期チョッパ圧負荷法の開発, 日本機械学会第 28 回バイオエンジニアリング講演会 (2016/1/9-10, 東京)

宮城英毅, 叢雅琳, 杉田修啓, 益田博之, 松本健郎: 経壁圧変化を利用した血管機能検査装置の開発~力学刺激を用いた血管の筋原性収縮応答から平滑筋機能の評価する~, 第 80 回日本循環器学会学術集会 (2016/3/18, 仙台)

〔図書〕(計 3 件)

Matsumoto T, Sugita S, Yaguchi T: Chapter 4. Blood Vessel, Springer Series in Biomaterials Science and Engineering: Advances in Metallic Biomaterials: Tissues, Materials and Biological Reactions (Niinomi M, Narushima T, Nakai M, eds.), Springer, 71-98 (2015)

松本健郎: 第 20 章「動脈硬化のバイオメカニクス: 生理学/メカニクス/診断」, メカノバイオロジー, 曾我部正博編, 化学同人, 243-250 (2015)

Matsumoto T, Sugita S, Nagayama K: Chapter 6.4 Tensile Properties of Smooth Muscle Cells, Elastin and Collagen Fibers, Vascular Engineering (Tanishita K and Yamamoto K, eds), Springer, 127-140 (in press)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 生体血管状態測定装置

発明者: 松本健郎, 狩野雅史, 矢口俊之, 益田博之, 塚原弘政

権利者: (株) ヨネクス, 名古屋工業大学

種類: 特許

番号: 特願 2014-163986

出願年月日: 2014 年 8 月 11 日

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

杉田 修啓 (SUGITA, Shukei)

名古屋工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：20532104

矢口 俊之 (YAGUCHI, Toshiyuki)

藤田保健衛生大学・保健学研究科・講師

研究者番号：70385483

(3) 連携研究者

長山 和亮 (NAGAYAMA, Kazuaki)

茨城大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：10359763

松本 明郎 (MATSUMOTO, Akio)

千葉大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：60437308