

# 血管内皮細胞の物質取り込みにおよぼす流れの影響

自律調節研究分野 内貴 猛, 坂井友幸, 狩野 猛

低密度リポ蛋白の血管壁への取り込みにおよぼす流れの影響を明らかにするため、培養血管内皮細胞単層へ取り込まれる蛍光微粒子量におよぼす流れの影響について調べた。その結果、微粒子の取り込みには、微粒子の流速依存性濃縮現象とせん断応力の変化に依存した細胞内小胞輸送能の変化が影響をおよぼすことがわかった。

## 1. はじめに

動脈硬化症は、動脈壁内にリポ蛋白（コレステロール）が過剰に蓄積して起こる病変であり、その発症や進展に血液の流体力学的因子（特に低壁せん断応力）が深く関与していることが指摘されている。しかし、なぜ壁せん断応力の低い部位にリポ蛋白が蓄積しやすく、動脈硬化病変が好発するのかはまだ明らかになっていない。リポ蛋白の取り込みに及ぼす流れの影響としては、我々が提唱している流速依存性濃縮現象<sup>(1-3)</sup>により血管内皮近傍においてリポ蛋白の濃度が増大または減少することと、血流により負荷されるせん断応力が内皮細胞への刺激となって細胞内の小胞輸送能が変化することが考えられる。そこで本研究では、血管内皮のモデルとして培養血管内皮細胞単層を、リポ蛋白のモデルとして蛍光微粒子を用いて流れの実験を行い、内皮細胞の小胞輸送による粒子の取り込みおよび流速依存性濃縮現象により起こる粒子の取り込みにおよぼすせん断応力の影響について検討を行った。

## 2. 試料及び方法

せん断応力のみの影響を調べた実験では、ウシ大動脈由来内皮細胞（BAEC）を直径 35 mm の水透過性のない培養皿に播種培養したものを、濃縮現象による影響を調べた実験では、直径 23 mm の水透過性のある多孔質フィルタ（pore size  $0.4\ \mu\text{m}$ ）に播種培養したものを使用した。

せん断応力のみの影響を調べた実験では、細胞

単層より 0.5 mm 隔てた位置に直径 32 mm の円板を配置し、これを一定速度で回転させることにより細胞にせん断応力を負荷した。濃縮現象を加味した実験では、細胞単層を幅 40 mm、高さ 0.5 mm のアクリル製平行平板型流路の一部になるように装着し、十分に発達した定常流によるせん断応力を負荷した。実験は、いずれの場合にも装置全体を恒温装置内に収容し、 $37^{\circ}\text{C}$ に保って行った。

ウシ胎児血清を体積濃度で20%になるように加えた細胞培養液（RPMI 1640）に、リポ蛋白のモデルとして直径がリポ蛋白と同程度の  $0.019\ \mu\text{m}$  の蛍光ポリスチレン粒子（FluoSpheres®, Molecular Probes, Inc.）を濃度が約  $4 \times 10^{13}$  個/ml（固形率0.015%）になるように混入したものを灌流液として使用した。

せん断応力の影響のみを調べた実験では、流れの実験終了後、内皮細胞を界面活性剤（Triton-X100）で溶解し、その溶解液の蛍光強度を蛍光分光光度計で測定することにより細胞内に取り込まれた蛍光微粒子の量を求めた。濃縮現象を加味した実験では、落射蛍光顕微鏡で細胞単層表面を細胞単層に対して垂直な方向から観察し、その中心（ $x=0\ \text{mm}$ ）、上流（ $x=-7\ \text{mm}$ ）、下流（ $x=7\ \text{mm}$ ）の三カ所において直径約 2 mm の円領域内における細胞単層の蛍光強度を顕微測光装置で測定した。その得られた蛍光強度の値を、内皮細胞のない上流側の部位（ $x=-20\ \text{mm}$ ）における蛍光強度により基準化し、さらに、最初の灌流条件における値で全ての値を基準化することにより流れおよび水透過速度の影響を評価した。

### 3. 結果及び考察

Fig. 1 は、内皮細胞単層に回転円板によるせん断流れを2時間負荷し、内皮細胞の小胞輸送のみによる粒子の取り込みを調べた結果を示したものである。これより、内皮細胞による粒子の取り込みがせん断応力の負荷により一時的に増加することがわかった。これは、細胞の食作用(phagocytosis)がせん断応力の増大によって活性化されることを示すものであるが、24時間せん断応力を負荷した後に、さらに2時間流れの実験を行い、せん断応力を負荷した場合には、粒子の取込量が減少し、せん断応力を負荷しない場合の値に近づくことから、細胞の小胞輸送能が、せん断応力の変化に追従して一時的にのみ変化することが示唆された。

内皮細胞単層に水透過性を付与し、流速依存性濃縮現象を加味した実験の結果は Fig. 2 に示したようになり、内皮細胞単層上の3箇所における蛍光強度は、壁せん断速度(流速)に依存して変化した。これは、壁せん断速度の大きさにより蛍光微粒子の濃縮量が変化することを示すものであり、その濃縮の程度は、壁せん断速度が  $0 \text{ sec}^{-1}$  の時に最も高くなることを示している。また、壁せん断速度を  $0 \text{ sec}^{-1}$  に設定した前後に同じせん断条件下で測定して得られた蛍光強度の差

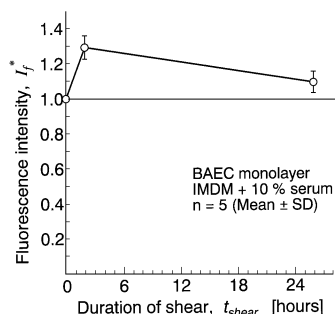


Fig. 1 The effect of the duration of exposure to shear flow on the amount of fluorescent microsphere uptake by BAEC monolayer in 2 hours.

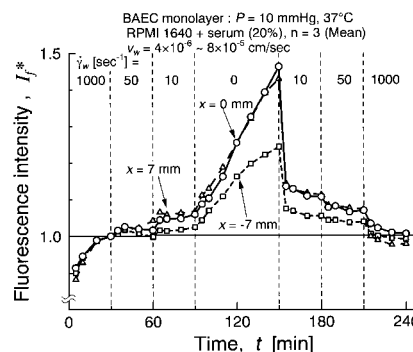


Fig. 2 The effect of wall shear rate on the amount of fluorescent microsphere accumulated on and uptaken by the BAEC monolayer.

から算出した内皮細胞単層に取り込まれた蛍光微粒子の量も、壁せん断速度に依存していることがわかった。以上の結果より、血管内皮細胞による微粒子の取り込みには、血管内皮の水透過性に起因する巨大分子の流速依存性濃縮現象と、せん断応力の変化に依存した小胞輸送能の一時的な変化が影響をおよぼすことが明らかになった。

### 4. おわりに

本研究で得られた結果は、二次流れや再循環流の形成などにより流れが局所的に遅くなり、壁せん断応力が非常に小さくなっている血管分岐部の外側壁や彎曲部の内側壁に沿って、動脈硬化が好発するというこれまでの研究結果を良く説明できる重要な資料であり、動脈硬化の局在化が血管内壁表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象によるものであるという我々の仮説を強く支持するものである。

### 謝辞

本研究の一部は、文部省科学研究費補助金奨励研究(A) No. 10780523および電子科学研究所プロジェクト研究費により行われたことを記し謝意を表す。

### [参考文献]

- [1] Karino, T., Deng, X.: 脈管学, 30, 710 (1990).
- [2] Karino, T., Deng, X., Naiki, T.: ASME BED 29, 13 (1995).
- [3] 狩野 猛, 和田成生, 内貴 猛: 電子科学研究 4, 22 (1996).