

細胞内微細構造インプロセス計測型マイクロ引張試験機の開発と評価

著者	松本 健郎
URL	http://hdl.handle.net/10097/41356

細胞内微細構造インプロセス計測型 マイクロ引張試験機の開発と評価

(課題番号 09558109)

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金
基盤研究(B)(2)研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 松本 健郎

(東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻)

東北大学図書



00010140822

附属図書館

細胞内微細構造インプロセス計測型 マイクロ引張試験機の開発と評価

(課題番号 09558109)

平成9年度～平成11年度科学研究費補助金
基盤研究 (B)(2) 研究成果報告書

平成12年3月

研究代表者 松本健郎

(東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻)

目 次

1. はしがき	1
2. 研究組織	2
3. 研究経費	2
4. 研究発表	2
4.1 学会誌等	2
4.2 口頭発表	3
5. 研究成果	4
5.1 緒 言	4
5.2 細胞用引張試験機	6
5.3 培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験	13
5.4 酵素分散法により単離した ラット血管平滑筋細胞の引張試験	24
5.5 粘弾性特性の解析	35
5.6 考 察	45
5.7 結 言	47
5.8 参考文献	48

1. はしがき

生体が長い年月をかけて最適化されてきたシステムであることを考えると、力学的にも最適な機構を多く有することが予想される。したがって、生体組織・器官の基礎をなす細胞が力学的環境の変化に対してどのように応答するのかを詳しく解析することにより、新しい機能を有する材料の設計・開発に関して、また、マイクロマシンの設計・開発などに関して、有意義な示唆や新たな視点を得ることができると考えられる。

このような研究の基礎として細胞の力学特性を安定して詳しく計測できる装置の開発が重要である。しかし、従来の細胞の力学特性の計測においてはマイクロ・ピペットで細胞局所の力学特性を調べる研究が主流であり、細胞全体の力学特性を幅広いひずみ範囲にわたって計測できる引張試験はあまり行われていない。また、引張試験に関連する研究も、そのほとんどは細胞の生理的特性を調べる目的で顕微鏡下で細胞を手動で操作するものであり、コンピュータ制御により様々な実験条件を再現性良く設定できる、いわゆる引張試験機と呼べるものは存在しない。また、使われる顕微鏡も倒立型のものがほとんどであり、細胞内の微細構造を観察できる程度の画質を持ったものは見られない。

そこで、本研究では3年間に亘り、細胞をコンピュータ制御により再現性良く引張ることができ、また引張りに伴う内部構造の変化を明瞭に観察できるような装置の開発を進めた。即ち、顕微鏡下に単離細胞を2本の微小ガラス針で把持し、一方の針をコンピュータ制御の電動マニピュレータにより移動させることにより細胞を引張り、その際の変形をビデオ録画しておき、後ほど、荷重-伸び関係を得る装置を開発した。様々な試行錯誤の末に決定された装置の概要は以下の通りである：

正立顕微鏡下に細胞の両端を細胞接着剤 (Cell-Tak) でコートしたガラスマイクロピペット(内径3~15 μ m)に吸引・固定し、一端のピペットを電動マニピュレータで引張った際の細胞の形状変化を詳細に計測できるようにした。また他端のピペットはカンチレバー型とし、細胞変形に伴うたわみ量の変化を画面上で計測し、後にこのカンチレバーのカーたわみ関係を較正することで細胞に加わる力を求める方式とした。画質向上のため正立顕微鏡下で水浸の対物レンズにより観察する系とした。これにより、通常の透過光においてであるが細胞内の微細な構造が観察できるようになった。また、顕微鏡の光軸方向の位置決めには従来主流であったステージ上下式ではなく、鏡筒上下式のものを用い、かつ長動作距離を有する対物レンズを採用することで複雑な実験操作を可能ならしめた。更に細胞を酸素加された37 $^{\circ}$ Cの保生液中で観察できるように顕微鏡ステージ上に設置できる小型の保温槽を開発した。

開発した装置の性能評価を行うために、2種類の細胞、即ち、Explant法(血管壁中膜を細切して培養皿中に放置し、これより遊走してくる平滑筋細胞を用いる方法)で得た継代6~7代目の培養ウシ胸大動脈平滑筋細胞(BASM)および酵素分散法(血管壁をコラゲナーゼおよびエラスターゼにより処理して細胞を単離する方法)で得たラット胸大動脈平滑筋細胞(RASM)に関し、37 $^{\circ}$ Cの生理的塩類溶液中で引張試験を行えることを確認した。また、性能評価の仮定を通じ、以下の知見が得られた：

まず、引張速度を変えたBASMの試験結果より、ひずみ速度と細胞の弾性特性との間にはひずみ速度4%/sec以上の領域では有意な相関のあることが明らかとなった。即ち、荷重を細胞の初期断面積(最大直径部分の断面積)で除して公称応力とし、荷重負荷前を基準としたピペット先端間距離の変化を公称ひずみとして、荷重-ひずみ関係から公称応力-ひずみ線図を得、これから代表弾性率(応力-ひずみ線図を直線と見做した場合の傾き)を求めたところ、ひずみ速度と有意な相関が見られた。また、3要素線形粘弾性モデル(Kelvinモデル)を用いてBASMの挙動を調べたところ、応力緩和の時定数が160秒程度であった。この時定数は白血球では1秒以下、線維芽細胞では40秒、内皮細胞では130秒と報告されており、平滑筋細胞が他の細胞と比べて非常に粘性的性質が強いことが判明した。一方、細胞種の違いに関しては、ひずみ速度が0.2~4%/secの範囲で行ったBASMとRASMの弾性率を比較したところ、BASMでは3kPa程度、RASMでは12kPa程

度と4倍程度高いことを見いだした。細胞採取方法の違いにより、BASMは収縮タンパクの少ない合成型、RASMは収縮タンパクに富む収縮型のフェノタイプを示していると考えられる。細胞内の収縮タンパク量の違いがこのような弾性特性の違いをもたらした可能性が考えられた。

今後は開発した装置で様々な細胞の力学特性を計測し、データを蓄積する一方、細胞の等尺性収縮や等張性収縮時の特性を計測できるように、装置の改良を進めていく予定である。

最後に本研究に対する援助に感謝し、はしがきとする。

2. 研究組織

研究代表者： 松本 健郎（東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻 助教授）

研究分担者：

- ・平成9～11年度 佐藤 正明（東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻 教授）
- ・平成10～11年度 大橋 俊朗（東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻 助手）
- ・平成9年度 片岡 則之（東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻 助手）
（現 川崎医療短期大学 医用電子技術科 講師）

研究協力者：

- ・平成9～11年度 小川原凱紀（東北大学 工学部 技術長）
- ・平成10～11年度 佐藤 潤平（東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻 大学院生）
- ・平成11年度 山本 光伸（東北大学 工学部 機械電子工学科 学生）
伊藤 仙和（東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻 大学院生）
- ・平成10年度 清尾 慎司（東北大学 工学部 機械電子工学科 学生）
- ・平成9年度 加藤 陽子（東北大学 大学院工学研究科 機械電子工学専攻 大学院生）

3. 研究経費

平成 9年度	2, 700千円
平成10年度	1, 600千円
平成11年度	1, 300千円
計	5, 600千円

4. 研究発表

4.1 学会誌等

- 1) Matsumoto T, Okumura E, Miura Y, Sato M: Effect of smooth muscle cells on the mechanical response of rabbit carotid arteries in culture, JSME International Journal, Series C 42-3, 514-520 (1999)
- 2) Matsumoto T, Okumura E, Miura Y, Sato M: Mechanical and Dimensional Adaptation of Rabbit Carotid Artery Cultured in Vitro, Medical & Biological Engineering & Computing 37-2, 252-256 (1999)
- 3) 松本健郎, 加藤陽子, 佐藤正明: 高血圧に対するラット胸大動脈平滑筋の力学応答, トヨタヒューマ

ンライフ支援バイオメカニクスシンポジウムII, 89-94 (1998)

- 4) 松本健郎：血管壁のバイオメカニクスと平滑筋細胞，混相流 12-4, 334-341 (1998)
- 5) 松本健郎，永野史朗，佐藤正明：平滑筋収縮・弛緩によるラット胸大動脈の残留ひずみ変化（大動脈上の位置による応答の変化），日本機械学会論文集C編63-607, 853-858 (1997)

4.2 口頭発表

- 1) 松本健郎，佐藤潤平，山本光伸，佐藤正明：細胞用引張試験機の開発とこれを用いた血管平滑筋細胞の引張特性の計測，第39回日本エム・イー学会大会 (2000/5/17-19, 東京，発表予定)
- 2) 佐藤潤平，松本健郎，伊藤仙和，山本光伸，佐藤正明：酵素分散法により単離したラット胸大動脈平滑筋細胞の力学特性の計測，日本機械学会バイオエンジニアリング部門第12回バイオエンジニアリング講演会 (2000/1/11-12, 金沢)
- 3) Matsumoto T, Seo S, Kato Y, and Sato M: Effect of hypertension on the morphology and contractile properties of smooth muscle cells isolated from rat thoracic aortas, Fourth International Conference on Cellular Engineering (1999/11/30-12/3, Nara, Japan)
- 4) 松本健郎：血管壁のメカニクスと力学的ホメオスターシス，日本機械学会東北支部米沢地方講演会 (1999/9/29, 米沢)
- 5) 松本健郎，伊東健太郎，佐藤正明：平滑筋収縮に伴う家兎動脈壁内ひずみ分布の変化—弾性動脈と筋性動脈の比較—，日本機械学会1999年度年次大会 (1999/7/27-9, 東京)
- 6) 加藤陽子，松本健郎，佐藤正明：高血圧がラット胸大動脈の壁内ひずみ分布に与える影響—平滑筋収縮・弛緩に伴う変化を考慮して—，日本機械学会バイオエンジニアリング部門第11回バイオエンジニアリング講演会 (1999/3/29-31, 筑波)
- 7) 松本健郎，加藤陽子，佐藤正明：高血圧に対するラット胸大動脈平滑筋の力学応答，第2回トヨタヒューマンライフ支援バイオメカニクスシンポジウム (1998/10/23-4, 名古屋)
- 8) 加藤陽子，松本健郎，佐藤正明：高血圧によるラット胸大動脈平滑筋の収縮特性の変化，日本機械学会第76期全国大会 (1998/10/1-4, 仙台)
- 9) 松本健郎，菅原静華，高澤和幸，佐藤正明：軸方向の変形を考慮した家兎胸大動脈壁内のひずみ分布解析，第37回日本エム・イー学会大会 (1998/5/14-16, 倉敷市)
- 10) 佐藤正明，奥村栄次郎，松本健郎：高内圧負荷による培養動脈のリモデリング，第11回日本エム・イー秋季大会 (1997/11/20-21, 横浜)
- 11) Matsumoto T, Okumura E, Miura Y, Sato M: Effect of Smooth Muscle Cells on Mechanical Response of Rabbit Carotid Arteries in Culture, Third International Conference on Cellular Engineering (1997/9/19-22, San Remo, Italy)
- 12) Matsumoto T, Nagano S, Sato M: Change in Residual Strain in Rat Thoracic Aorta Due to Smooth Muscle Contraction/Relaxation: Positional Variation along the Aortic Tree, 日本機械学会創立100周年記念 International Conference on New Frontiers in Biomechanical Engineering (1997/7/18-9, Tokyo)
- 13) Matsumoto T, Takasawa K, Sugawara S, Sato M: Two-dimensional Change in Zero-stress Configuration of Rabbit Thoracic Aorta Due to Smooth Muscle Contraction, First International Interdisciplinary Conference on Cardiovascular Medicine, Surgery, Science, and Mechanics (1997/6/6-9, Washington, DC, USA)

5. 研究成果

5.1 緒言

5.1.1 研究の背景

近年、生体から取り出した組織や細胞を生体外で培養、増殖させ、生体内に存在した時と同様の機能や形態にした後、生体内の病変や損傷した部位と置換するといったTissue Engineeringと呼ばれる研究が非常に盛んに行われている。皮膚などの比較的構造の簡単でかつ扱いやすいものでは、研究が進んでおりすでに実用化している。しかし血管のような構造が複雑で力学的環境の影響を受けやすい組織ではまだ研究の初期段階である。生体組織は、力学的環境の変化に应答してリモデリングすることが知られており、例えば筋肉を使うことで筋肉は太くなり、使わなければ細くなることがあげられる。この生体組織の持つリモデリングの機能を利用すれば、生体外で組織に負荷を加えて培養し、望みの力学特性を付与した後に生体内の組織と置換するといったTissue Engineeringも可能と考えられる。

現在までにリモデリングのメカニズム解明のために様々な研究が行われてきた。血管壁の場合、中膜に存在する平滑筋細胞がリモデリングの実際を司っている。この細胞はその収縮、弛緩により血管壁の能動的な収縮を支配すると同時に力学的環境の変化に応じて自らがその形態や機能を変化させ、血管壁の応力、ひずみ状態を制御する非常に興味深い要素である。従来、力学的環境の変化が平滑筋細胞に与える影響を調べる場合には、血管壁全体の力学的性質の変化を計測するマクロ的視点の評価が主であった。しかし、リモデリングの主体である平滑筋細胞それ自身の力学的性質をより詳細に知るためには、単離した個々の細胞について実験することが重要である。また、Tissue Engineeringの見地からは、細胞に力学的刺激を加えてつつ培養し、組織を形成させることにより、組織の機能的特性を改質・改善する方法が考えられているが、この場合その効果を細かく知る上からも、培養した細胞と生体内に存在する細胞との力学特性の違いを知る必要がある。よって、個々の細胞の力学特性を計測することは非常に重要であり、細胞の力学特性を理解することがリモデリングのメカニズムの解明、及び、Tissue Engineeringの発展につながると期待される。

5.1.2 細胞の力学特性測定法

細胞の力学的性質の計測に関して、これまで様々な方法が報告されている。例えば細胞表面の局所的な力学的性質を計測する方法としては、マイクロピペットを細胞表面に接触させ陰圧をかけた際の吸引圧と試料の吸引変形量から力学的特性を計測するマイクロピペット吸引法 (Sato et al, 1987; Theret et al, 1988), 原子間力顕微鏡プローブによる押し込み試験 (長山, 1998) などがあり、細胞内部の力学的性質を計測するものとしては、細胞に遠心力をかけた際の原形質内粒子の移動量から細胞質基質の粘度を計測する遠心法、細胞内に磁性体の粒子を入れ磁場をかけた際の粒子の運動から力学特性を計測する磁粒法 (Crick et al, 1950) などがある。また、細胞全体の力学的性質を計測する方法としては一対のマイクロピペットにより細胞に引張を負荷した引張試験 (Palmer et al, 1996), 一対のマイクロプレートにより細胞に引張、圧縮をかけた粘弾性試験 (Thoumine et al, 1997), 超音波を用いた硬さ測定試験 (Omata, 1996) などがあり、各種細胞の力学的性質が調べられている。特に細胞全体の力学的性質を知ることは細胞を一つの複合システムとして理解するため、また大変形を評価するために非常に重要であり、これを計測できる引張試験は非常に有用な方法と考えられる。しかし、細胞の力-伸び関係を求めるまで行われた細胞の引張試験の報告は数少ないし、まだあまり多くのことは解っていない。

細胞の引張試験の報告としては、上記のPalmerらによる単離した心筋細胞を5 μ mずつ伸ばした際の力の計測やThoumineらによる培養線維芽細胞の粘弾性特性計測の他に、Miyazakiら (2000) は培養線維芽細胞の力-伸び関係を計測している。平滑筋細胞についてはWarshawら (1983) はカエルの胃から単離した平滑筋細胞、Grerumら (1990) はブタの膀胱とヒトの子宮から単離した平滑筋細胞の引張試験を報告している。しかしながら血管平滑筋細胞においては、その収縮特性について多く報告されているものの、引張試験に関す

る報告は著者の知る限り、長谷川ら（2000）が行った培養血管平滑筋細胞の引張試験のみである。さらに、単離した血管平滑筋細胞についてはまだ報告されていない。

5.1.3 本研究の目的

前節でも述べたように、一般の生体軟組織の引張試験と比べて細胞の引張試験はほとんど行われていない。しかし従来の細胞引張試験の多くは操作性の観点から倒立型の顕微鏡を用いている。この場合、細胞と対物レンズの間にスライドグラス等が入るために画質が劣化する問題がある。このため水中で把持された細胞内部を明瞭に観察することは困難な場合が多いと言える。また引張に伴う細胞内部の変形を計測できる画像の鮮明さをもったものは見当たらない。そこで本研究では、細胞の内部構造を明瞭に観察でき、精度の良く力を計測できる細胞用引張試験機を開発し、これを用いて血管リモデリングの代表的要素である血管平滑筋細胞の引張特性を計測することを目的とする。具体的には、細胞は一般に粘弾性特性を示すことが知られていることから、まず第1に、血管平滑筋細胞の粘弾性特性を評価するため、引張速度の違いによる力学特性の影響を調べる。ここでは培養したウシ血管平滑筋細胞を用いて引張試験を行う。しかしながら、培養細胞は生体から切り離され人工的環境におかれているため、しばしば生体内で示す反応とは異なった反応を示す。特に血管平滑筋細胞は発生や増殖状態に応じて形質を大きく変換するため、培養血管平滑筋細胞は生体内に存在したときのような細長い形状をしておらず、筋フィラメントが乏しく膜様構造に富み、“合成型”と呼ばれるフェノタイプ（遺伝子によって発現された形質の型）に変換することが知られている。一方、生体の動脈中膜に存在する平滑筋細胞は筋フィラメントが多く“収縮型”と呼ばれる。この二つのフェノタイプでは有する筋フィラメントの量が異なるため、力学特性に違いがあると考えられる。そこで第二に、収縮型の血管平滑筋細胞が得られる酵素分散法によりラット胸大動脈から単離した血管平滑筋細胞の引張試験を行い、合成型と比較してフェノタイプによる力学特性の違いを評価することを目的とした。

5. 研究成果

5.2 細胞用引張試験機

5.2 細胞用引張試験機

5.2.1 装置の仕様条件

細胞用引張試験機の開発にあたり装置に必要とされる条件がいくつかある。第一に細胞の大きさは約10~100 μm であるので、細胞の引張の様子を観察するため顕微鏡下で細胞に引張を负荷できる機構が必要であり、さらに細胞の内部構造を観察できるような、より鮮明な像を得られる顕微鏡であることが望まれる。第二に細胞に引張を负荷した際の微小な引張荷重を精度よく計測できなくてはならない。細胞の発生する力のレベルは数 μN のオーダーであるので力の分解能は0.1 μN 程度必要となり、市販のロードセル等では計測が非常に困難であるため、細胞レベルの力を計測できる機構が必要である。第三に細胞をより生理的状态に近い環境で実験することが望まれるため、温度37 $^{\circ}\text{C}$ 、pH7.3~7.6の状態を維持する必要がある (Table 5.2.1参照)。以上の条件を考慮し、細胞用引張試験機の開発を試みた。

Table 5.2.1 装置の仕様条件

	一般の細胞	装置仕様
構造	細胞膜, 細胞質, 核 など	内部構造を観察可能な 像の鮮明さ
大きさ	10~100 μm	長さの分解能 0.1~1 μm 程度
発生力	数 μmN	力の分解能 0.1 μN 程度
環境	生体内環境	温度37 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.3~7.6

5.2.2 装置構成

開発した細胞用引張試験機の全体図をFig.5.2.1に、引張部の詳細をFig.5.2.2に示す。防振台 (AIT-LM, メイリツ) の上に置いた正立顕微鏡 (BX50WI, オリパス) の側方に手動マイクロマニピュレータ (MHW-3, ナリシゲ), もう一方には電動マイクロマニピュレータ (MMS-77, 島津製作所) を、それぞれ厚さ10mmのアルミ板から作製した固定治具を用いて設置した。対物レンズには水浸型60倍レンズ (LUNPlanFI 60 \times /0.90 W, オリパス) を用い、これにより通常の倒立顕微鏡の対物レンズでは得られない鮮明な像を得ることができる。顕微鏡ステージ上にはシリコンラバーヒータにヒーティングブロックを固定して作製した恒温槽を載せ、細胞の入ったディッシュ内の溶液を37 $^{\circ}\text{C}$ に保つことができるようにした (清尾, 1999)。温度の制御は温度コントローラのリレー制御を用いてヒータのスイッチをON, OFFして行った。電動マイクロマニピュレータ側には引張作動ピペット (Operation pipette), 手動マイクロマニピュレータ側にはたわみピペット (Deflection pipette) をそれぞれピペットホルダーを介してマイクロマニピュレータに連結した。この両ピペットの詳細については次節で述べる。細胞を把持する際には微小な吸引圧を利用するため、引張作動ピペットにはマイクロインジェクタ (IM-6, ナリシゲ) を接続した。たわみピペットにはマイクロインジェクタを接続せず、毛細管現象による微小な陰圧を利用して細胞を吸引する方法を採用した。細胞はこの対向する2本のマイクロピペットの間で把持し、電動マイクロマニピュレータを水平に移動させ、これに連結した引張作動ピペットをたわみピペットから遠ざけることにより引張を负荷する機構とした。引張を行う際の電動マイクロマニピュレータの制御はRS232Cケーブルを介してコンピュータ (PowerBook G3 233/14", Apple Computer) により制御した。引張を负荷した際の細胞に加わる力の測定は、たわみピペットに設けたカンチレバー部 (Deflection part) のたわみから求める方法とした。このピペットは先端から1~4mmの位置でFig.5.2.2に示す

ように90°に屈曲させており、たわみをピペット先端の変位で計測できる。細胞の引張の様子は対物レンズからリレーレンズ(PE2.5X, オリンパス)を介してCCDカメラ(TM1650B, 東芝)で撮影してビデオに録画する。解析の際にはビデオを再生し、ウィズスアナライザ(3161, 浜松ホトニクス)にて両方のピペットの変位を計測し、電圧(0-10V)として12bitのA/Dコンバータ(DAQCard-1200, National Instruments)を介してコンピュータに取込んだ。データの計測, 計算, マニピュレータの制御には汎用計測・制御ソフトウェアLabVIEW(ver. 5.0, National Instruments)を用いた。

5.2.3 マイクロピペットの作製法

引張作動ピペットおよびたわみピペットの両マイクロピペットは一本のガラス管から作製した。培養ウシ血管平滑筋細胞には薄肉のガラス管(G-1, ナリシゲ)から作製した内径8~15 μm の薄肉ピペットを用い、単離ラット平滑筋細胞には肉厚のガラス管(リングキャップス10 μl , 井内)から作製した内径3~8 μm の肉厚ピペットを用いた。最初にガラス管をピペットプーラ(PP83, ナリシゲ)で引き延ばし、直径を縮小し、その後マイクロフォージ(MF90, ナリシゲ)による加工, ガスバーナによる熱処理によりそれぞれのマイクロピペットを作製した。

まず、ピペットプーラによる先端径の縮小を以下の手順で行った:

1. ガラス管の中央がピペットプーラの熱線の位置にくるようにセットする。ガラス管をセットする前に、熱線の位置は上限まで上げておく。
2. NO.1 HEATERの目盛を約65, NO.2 HEATERの目盛を約70(肉厚ガラス管の場合はNO.1 HEATERの目盛を約80, NO.2 HEATERの目盛を約85)にセットする。この目盛の値は用いるガラス管やその時の気温などにより異なるため、随時、調節する必要がある。
3. 2段引きを行うためのストッパーを5mm程度下にセットする。
4. スタートボタンを押して1段引きを行う。
5. ストッパーをはずし、熱線を細くなっているピペットの中央にくるように約2mm下げて、もう一度スタートボタンを押して2段引きを行いガラス管を切断する。

ここで切断したガラス管の上側で固定した側が引張作動ピペット, 下方に引き落とされた側がたわみピペットとなる。引張作動ピペットはテーパのついている部分が短く約6mm程度である。これに対し、たわみピペットはテーパが小さく細長く伸びた形状であり、この細長く伸びた部分が細胞レベル(数 μN)の力を検出するたわみ部となる。このたわみ部の長さは約15~20mm, 直径は20~50 μm である。

次に、引張作動ピペット及びたわみピペットともマイクロフォージ(MF90, ナリシゲ)を用いて先端径の大きさ及び形状を確認し、内径が小さすぎるものや端面が平坦でないものはマイクロフォージを用いて加工する。マイクロフォージの熱線に融点の低いガラスを溶かし直径30 μm 以上のガラス玉を作る。加工するマイクロピペットは融解せずにガラス玉のみが融解するように熱線に流す電流を調節した後、マイクロピペット先端10~30 μm をガラス玉に接触させる。その後、熱線のスイッチを切り、マイクロピペットを上方に引き上げるとガラス玉との境界から10 μm 程度上方の位置でピペットが切断される。この加工によりマイクロピペット先端面を非常に平坦にできる。

たわみピペットはさらにマイクロフォージを用いて先端近傍を曲げる加工を行う。たわみピペットをFig.5.2.3に示すようにマイクロフォージの熱線に近づけると、熱線の温度による上昇気流によりピペットが上方に屈曲する。この際、ピペットを図のようにピペットが屈曲した面内で反時計方向に回転させることにより、ピペット先端近傍を90°に曲げることができる。この曲げる位置は薄肉ピペットの場合は先端から約1~2mmであるが、肉厚ピペットの場合は屈曲による内径の潰れが起るため、先端から約3~4mmの位置で曲げる。

最後にクリーンベンチ内のガスバーナの種火でマイクロピペットの根本側を加熱し屈曲させる。それぞれ

5. 研究成果

5.2 細胞用引張試験機

2回ずつ屈曲させ、Fig.5.2.4に示すような形状にした。

以上の方法で作製した両マイクロピペットを試験前にそれぞれ20本前後準備した。使用する際には細胞接着剤Cell-Tak (Becton Dickinson) を用いて先端をコーティングし (コーティング方法の詳細は5.3.1で述べる) , 一度実験に使用したものは破棄し、常に新しいピペットを使用した。

5.2.4 クロスキャリブレーション法

たわみピペットのバネ定数はクロスキャリブレーション法を用いて求めた。この方法はバネ定数の既知のはりとはバネ定数未知のはりの先端を押しつけたときのたわみの比から未知のバネ定数を求める方法である。既知のバネ定数 k のはりの先端に未知のバネ定数 k' のはりの先端を押しつけ、バネ定数 k のはりの先端のたわみ y を計測する。次にこのバネ定数 k のはりを未知のバネ定数のはりから離して、未知のバネ定数 k' のはりの先端のたわみ y' を計測する。これにより未知のバネ定数 k' は $k' = \frac{y}{y'}k$ から求められる。このクロスキャリブレーションを繰り返すことにより、より小さいバネ定数を求めることができる。

本実験では、最初のはりとしてステンレスのはり (15×3×0.1mm) を用い、あらかじめ電子天秤で重量を測定した接着剤添付済のおもりをステンレスのはり先端に載せ、このはり先端を水平方向からCCDカメラで撮影し、おもりによるたわみを計測してこのはりのバネ定数を求めた。次にたわみピペットと同様の方法で作製した細長く伸びた形状のピペットを、バネ定数を求めたステンレスのはりでクロスキャリブレーションを行い、未知のピペットのバネ定数を求めた。ここではピペットをマイクロメータヘッドで、ステンレスのはりをラボジャッキで固定し、はり先端を水平方向からCCDカメラで撮影してたわみを計測した。このピペット以降行ったクロスキャリブレーションは、本実験装置の両マイクロメニピュレータにピペットを取り付けて、対物レンズ20倍、及び40倍を用いてCCDカメラで撮影して行った。最終的にたわみピペットのバネ定数測定に用いたキャリブレーション用ピペットのバネ定数は0.040N/mおよび0.011N/mであり、引張試験終了後に使用したたわみピペットのバネ定数を求めた。

5.2.5 解析方法

本実験装置では引張試験中における細胞引張の様子をビデオに録画し、実験終了後にビデオを再生し解析する方法をとった。再生したビデオの映像をモニタ上に映し出し、ウィズスアナライザを用いて二値化を行い、引張作動ピペット及びたわみピペットの先端に計測ウインドウを合わせ、それぞれのピペットの変位を計測して電圧 (0-10V) としてコンピュータに取込んだ。このときのサンプリング周波数は、それぞれの引張試験に要した時間により異なり、一つの引張試験におけるサンプリングの総数が500~3000個となるように決定し、2, 5, 10, 50, 100Hzを用いた。取り込んだ電圧のデータ (V) を、10 μ m目盛のスケールを撮影して求めた電圧と長さの関係から、ピペットの変位データ (μ m) にした。細胞の伸びは、引張作動ピペット先端の変位からたわみピペット先端の変位を減じることにより求め、細胞に加わる張力はたわみピペット先端の変位にたわみピペットのバネ定数を乗ずることにより求めた。伸び、変位のデータはtext形式のファイルとして保存した。以上の計測、計算は汎用計測・制御ソフトウェアLabVIEWにより作製したプログラムを用いて行った。

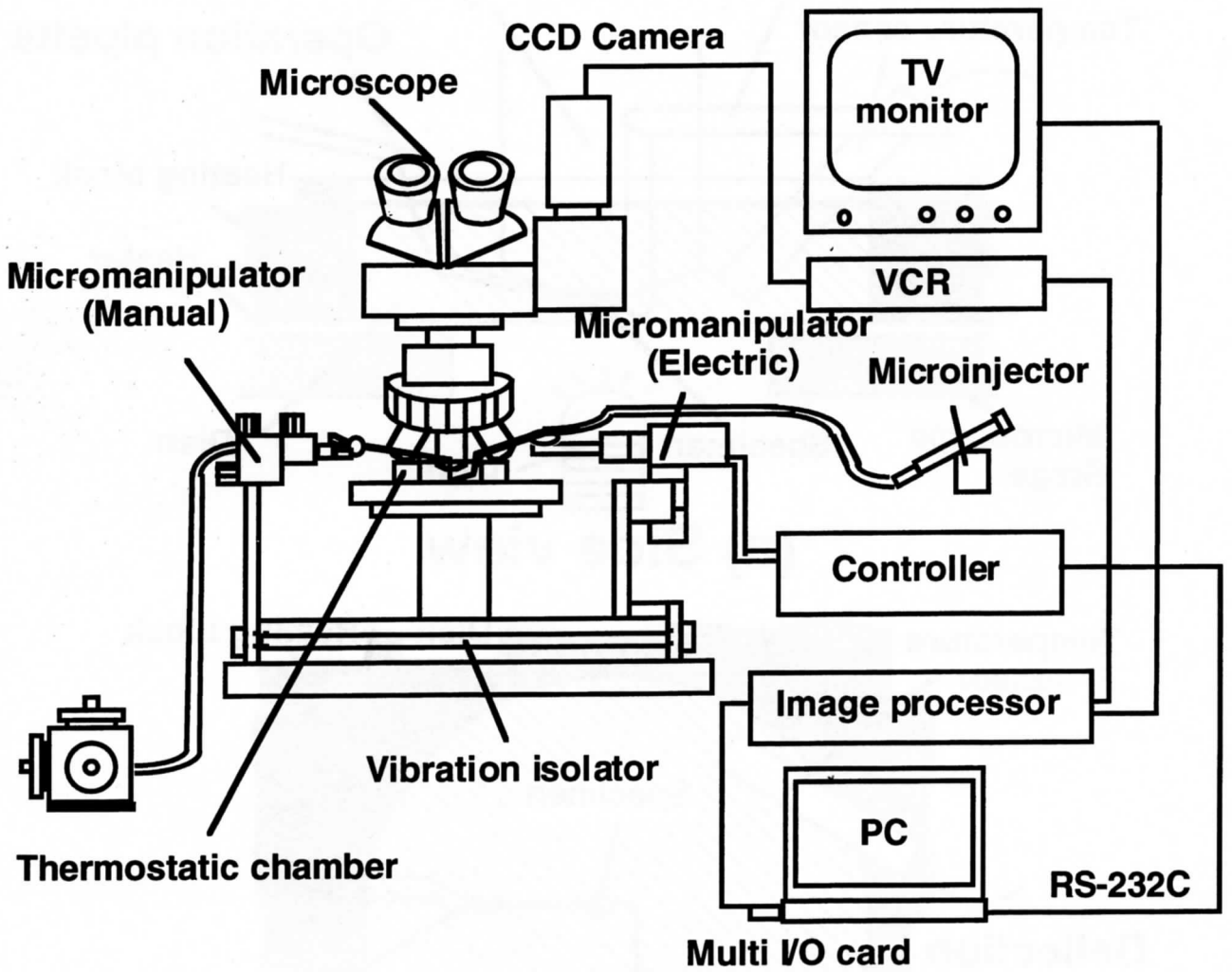


Fig.5.2.1 実験装置全体図

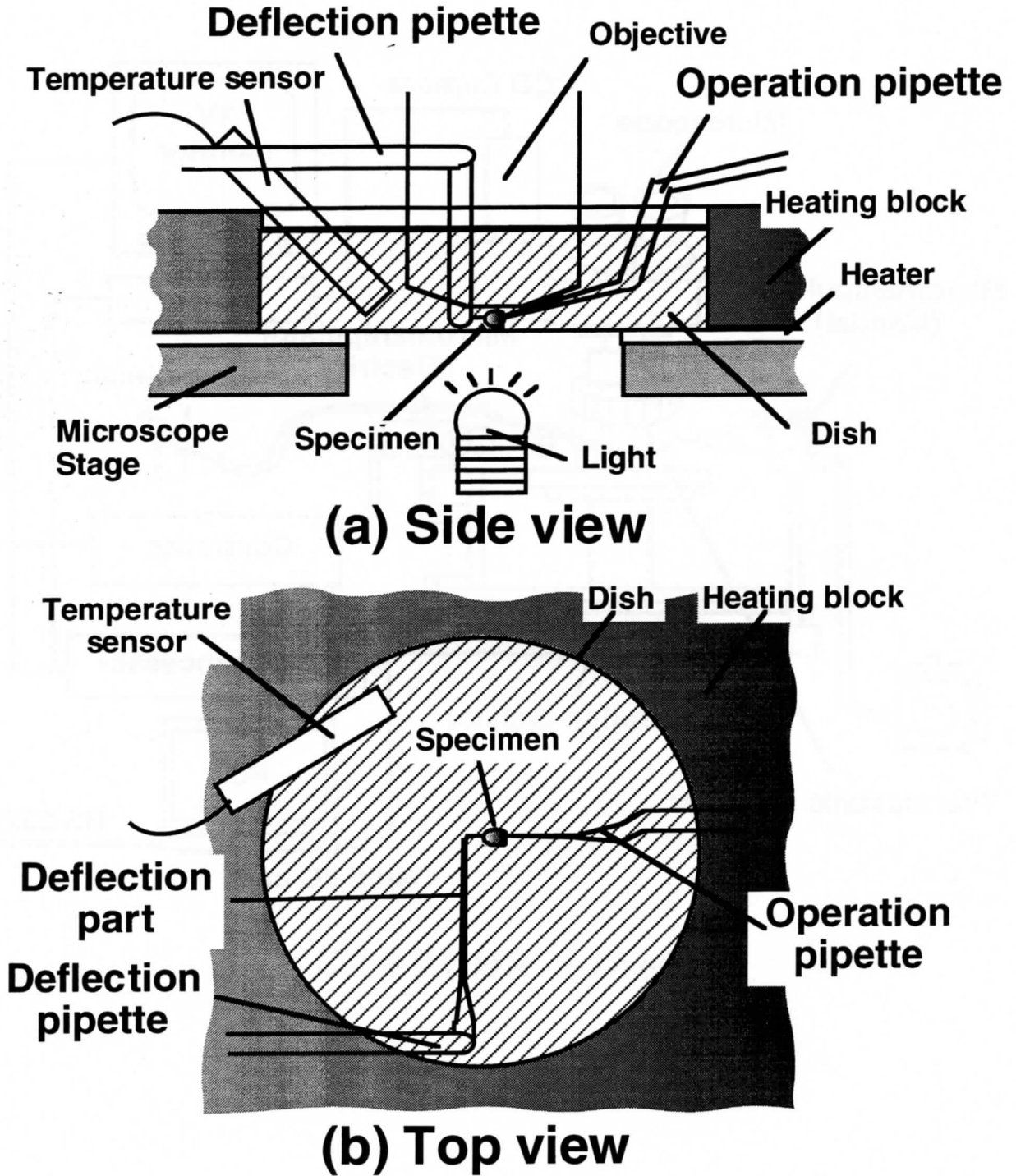


Fig.5.2.2 引張部詳細

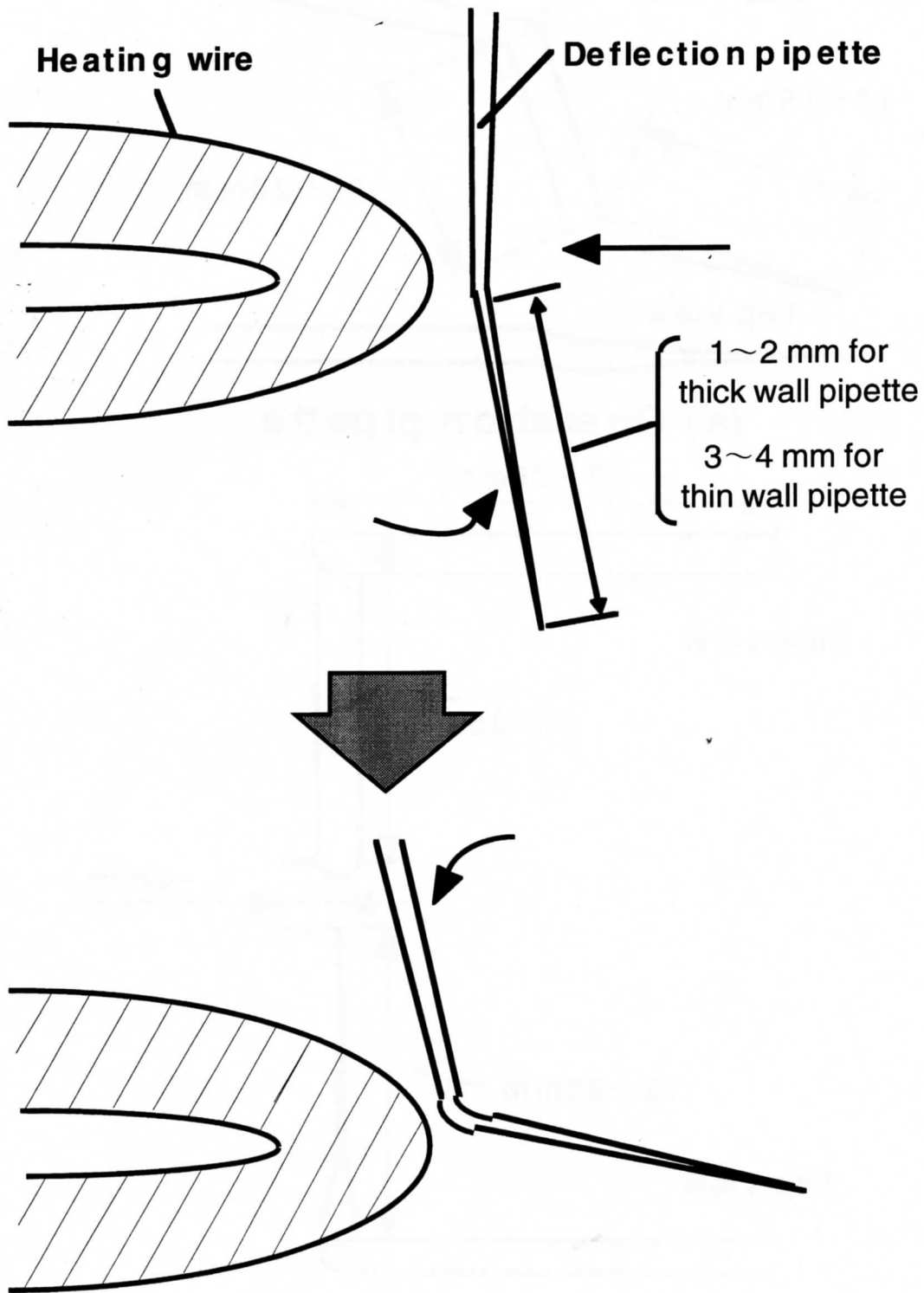
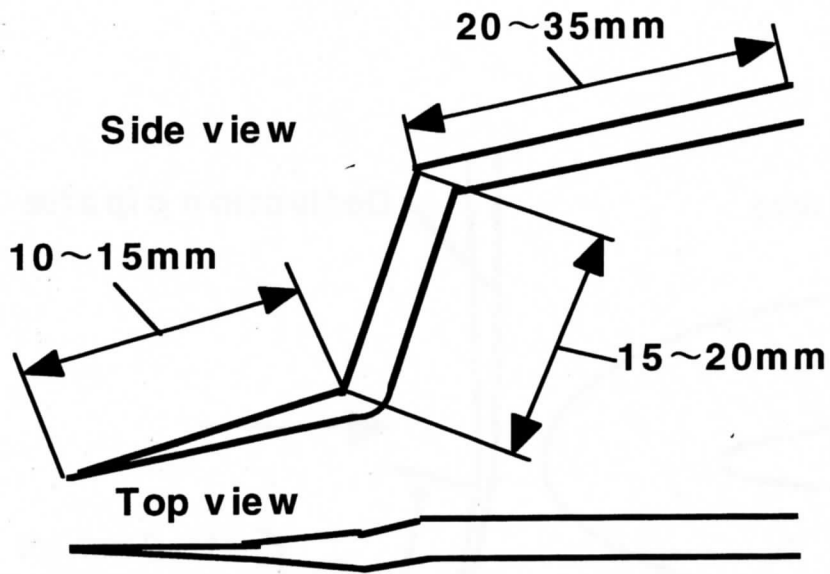
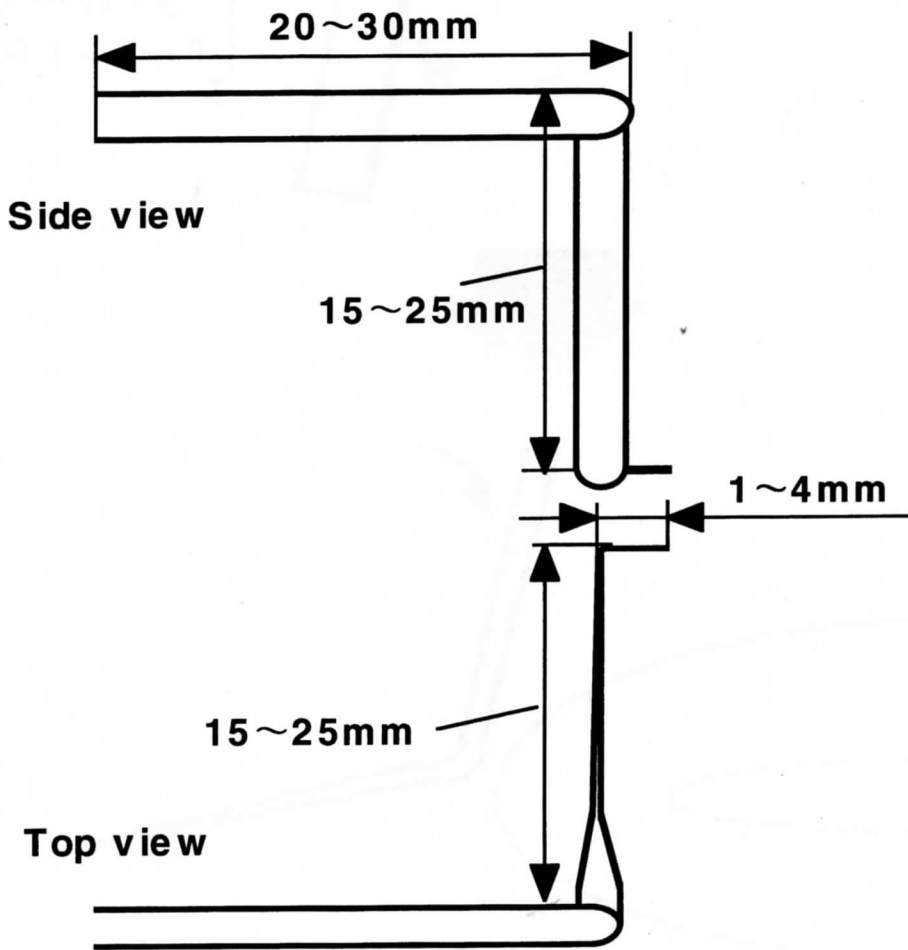


Fig.5.2.3 たわみピペット先端部の曲げ方



(a) Operation pipette



(b) Deflection pipette

Fig.5.2.4 マイクロピペットの形状

5.3 培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験

5.3.1 方法

細胞の準備 ウシ胸大動脈から移植片 (explant) 法により平滑筋細胞を単離した。この方法は、血管を切り刻み、この移植片を温度37℃、二酸化炭素5%に保たれたインキュベータ内で培養することにより、遊走してくる平滑筋細胞を採取する方法である。これにより採取した血管平滑筋細胞を6から7代、継代培養した。使用する際には、トリプシン (Trypsin-EDTA, GIBCO) で基質から剥がし、培養液を加え、遠心分離器 (H-108M2型, 国産遠心器株式会社) を用いて遠心分離 (1000rpm, 5分) した後、上澄みを捨てPBS(-)を加えて細胞を懸濁し、この溶液を直径35mmの浮遊細胞用プラスチックディッシュ (MS-1135R, スミロン) に移した。

試験方法 あらかじめ37℃に温めたステージ上の恒温槽に、細胞の入ったディッシュを設置し、浮遊細胞がディッシュ底面に沈むまで2~3分放置した。次に、使用する引張作動ピペット先端を細胞接着剤Cell-Takでコーティングした。コーティングは、Cell-Takの原液を25ゲージの注射針を用いて約0.05ml吸い取り、プラスチックディッシュのふたに滴下し、水滴を作る。これにPBS(-)を同様の方法で滴下し、約1:1の混合溶液の水滴を作った後、ピペット先端をこの混合溶液の水滴に3~5秒接触させることによりコーティングした。コーティングした引張作動ピペットをピペットホルダーに取り付け、滅菌フィルターを接続した10mlシリンジを用いて根本側からピペット内をPBS(-)で満たした。ピペットホルダーからシリンジをはずした後、このピペットホルダーを電動マニピュレータに取り付け、マイクロインジェクタに接続した。次に、電動マニピュレータを操作し、引張作動ピペット先端をディッシュ底面に沈んだ細胞の近傍に近づけ、マイクロインジェクタにより細胞膜が2~3 μm 吸い込まれる程度の微小な陰圧を負荷して細胞を把持した。細胞の把持を確認後、ピペットを上方に移動させて細胞を持ち上げた。次に上記と同様の方法でCell-Takをコーティングしたたわみピペットをピペットホルダーを介して手動マニピュレータに取り付けた。この際、たわみピペット内には水を満たさないで置く。これにより、たわみピペットをディッシュ内の溶液に浸すと毛細管現象により微小な陰圧が発生する。この微小な陰圧を利用して細胞の他端を把持した。その後、Cell-Tak硬化のため15~20分放置した。この際、たわみピペットの先端部のx方向位置が移動しないように両マイクロピペットを移動させ調節した。Cell-Tak硬化後、コンピュータにより電動マニピュレータを制御して、引張作動ピペットを水平に移動させ、細胞に引張を負荷した。電動マニピュレータをコンピュータで制御する際の最小移動距離は1 μm であるので、細胞に与える引張は引張作動ピペットをステップ状に移動させて行った。

培養ウシ平滑筋細胞の粘弾性特性を評価するため、様々な引張速度で引張試験を行った。この時の引張作動ピペットの移動は、最も速いもので、ピペットを3 μm 移動させ1s停止を繰り返したものであり、遅いものではピペットを1 μm 移動させ10s停止を繰り返したもので行った。

引張試験に用いたマイクロピペットはすべて薄肉のガラス管から作製したものであり、用いたたわみピペットのバネ定数は0.002~0.684N/mで、平均0.160N/mあった。

5.3.2 結果

引張試験に用いた培養ウシ血管平滑筋細胞の直径はおおよそ12~20 μm であり、細胞を把持した際の断面直径は15.6 \pm 1.1 μm 、ピペット間隔は11.4 \pm 0.79 μm (n=10, mean \pm SEM) であった (Table 5.3.1)。細胞に300%程度まで引張を加えることができたが、その後は細胞がピペットから滑り始めることが多く、細胞の破断まで計測することはできなかった。

培養ウシ血管平滑筋細胞の引張の様子をFig.5.3.1に示す。正立の顕微鏡で水浸型の対物レンズを用いたことにより、引張途中の細胞の像を明瞭に観察できている。細胞の断面積は伸長された状態では一様ではなく、細胞の部位により力学特性に違いのあることが示唆された。

Fig.5.3.2に、引張作動ピペットを5 μm 移動させ5s停止を繰り返して引張を負荷したものの、Fig.5.3.3に、引張

5. 研究成果

5.3 培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験

作動ピペットを $1\mu\text{m}$ 移動させ10s停止を繰り返して引張を負荷したものの、細胞の伸びと力の経時変化を示す。細胞に加わる引張速度は、伸びの経時変化の曲線における中央付近の全曲線長の3割程度の範囲の傾きから求めた。Fig.5.3.2の引張作動ピペットを $5\mu\text{m}$ 移動させ5s停止を繰り返して引張を負荷したものでは、細胞を $10\mu\text{m}$ 伸ばすのにかかった時間は約15秒であり、この場合では1回のステップごとに著しい応力緩和やクリープが観察された。また引張を負荷するに従い、応力緩和やクリープの絶対量が増加している傾向が見られた。Fig.5.3.3の引張作動ピペットを $1\mu\text{m}$ 移動させ10s停止を繰り返して引張を負荷したものでは、細胞を $10\mu\text{m}$ 伸ばすのに約6分かけており、1回のステップによる応力緩和やクリープはほとんど見られないが、Fig.5.3.2と同様に引張を負荷するにつれ伸びの増分は増加していき、力の増分は減少している傾向があった。

Fig.5.3.4に様々な引張速度で計測した培養ウシ平滑筋細胞の力-伸び関係を示す。Fig.5.3.2に示したように著しい応力緩和やクリープを示したものは、白抜きの丸で示したような応力緩和やクリープが進行した点を採用した。Fig.5.3.4の力-伸び関係によれば、引張速度が速いものほど曲線の傾きが急峻になる傾向が認められた。しかしながら、伸びの初期の段階では傾きが等しいように見受けられる。

Fig.5.3.5に公称応力-ひずみ線図を示す。公称応力 s は、力 F を細胞を把持した際の初期の断面積 A_0 で割った値である。Fig.5.3.4よりも顕著に、ひずみ速度が速いものほど傾きが急峻になっている。

Fig.5.3.6にひずみ速度-代表弾性率関係を示す。ここで求めた代表弾性率は、個々の細胞の公称応力-ひずみ線図におけるすべての点を原点を通る直線として最小自乗法で近似したときの傾きで求めた。ここでは、ひずみ速度の速いものほど有意に代表弾性率が増加している。

Fig.5.3.7にひずみ速度-初期弾性率関係を示す。ここで求めた初期弾性率は、個々の細胞の公称応力-ひずみ線図において、ひずみが0.2までのデータを原点を通る直線として最小自乗法で近似したときの傾きで求めた。ここで、Fig.5.3.5に示したひずみ速度 $7.1\%/s$ で引張を負荷したデータは、用いたたわみピペットのバネ定数が大きく($k=0.684\text{N/m}$)、力の精度が良くないため、初期弾性率計測には不向きと判断し、採用しなかった。ここではひずみ速度と初期弾性率に有意な相関はなく、ひずみ速度による初期弾性率の変化が見られなかった。

5.3.3 考察

本実験で計測した力は細胞を引張った際の細胞全体で負担した荷重であり、この力が細胞内部のどの組織で負担したかは不明である。ウニやヒトデの卵細胞では、細胞全体としての硬さは主として表層、細胞膜、細胞外被からなる細胞表面構造に由来し、内部原形質は全体としての硬さにあまり関与していないという結果が出ているが、細胞の種類によっては内部原形質の力学的性質が全体の性質の大きな部分を占める場合も考えられる。特に平滑筋細胞のような筋細胞では、収縮機能を付与するため非常に多くの筋フィラメントを有しており、これら原形質内の細胞骨格が細胞全体の硬さに大きく関与していると考えられる。これら細胞骨格の影響を評価するため、コルヒチンやサイトカラシンにより微小管やアクチンフィラメントを破壊し引張試験を行うことが必要と思われる。

Fig.5.3.2で見られたようなクリープや応力緩和などの粘弾性的性質は、内部原形質ばかりでなく、表層、細胞膜、細胞外被などの表面構造にも由来すると考えられる。内部原形質の粘度は5.1.2節で述べた遠心法などにより測定できるため、細胞全体で示す粘弾性特性と比較することで、細胞表面の粘弾性を評価することも可能であると考えられる。

Fig.5.3.4, Fig.5.3.5で示した力-伸び関係及び公称応力-ひずみ関係では、引張速度及びひずみ速度が速いものほど傾きが急峻になっており、引張、ひずみ速度の影響が引張試験において非常に重要であることが分かる。これも細胞の粘弾性的性質によるものであるが、変形や力の加え方がゆっくりの場合には弾性要素や塑性要素が関係し、速やかな場合には粘性要素が関係してくる。よって粘性要素を取り除き弾性要素のみの力学特性を計測するならば、非常にゆっくりとした変形で引張試験を行う必要がある。

Fig.5.3.6, Fig.5.3.7ではひずみ速度に対する代表弾性率及び初期弾性率の影響を見た。Fig.5.3.6に示した公称応力-ひずみ関係の全体の傾きから求めた代表弾性率は、ひずみ速度の増加に伴い有意に代表弾性率が増加している。しかしながらひずみ速度4%/s以下では有意な相関はなく代表弾性率に影響がないと考えられる。これに対し、Fig.5.3.7で示した、ひずみが0.2までの範囲から計算した初期弾性率ではひずみ速度に対する有意な差は見られなかった。これは変形が初期の段階では粘性の影響が小さく、ほとんど無視できるため、初期弾性率には速度の影響が見られなかったと考えられる。

5.1.2節で述べた他の引張試験の報告によると、Palmerら(1996)は心筋細胞を60 μm 伸ばした時に約5 μN の力を検出しており、この際の引張は1分間で5 μm づつ伸ばして行われている。Thoumineら(1997)は培養線維芽細胞に12 μm の引張を加え、維持した際の力の経時変化を計測している。ここでは、最初に引張を加えた際、0.11 μN の力を検出しており、その後応力緩和が観察され、6分後には約0.07 μN の力を検出している。Miyazakiら(2000)は培養線維芽細胞を用いて、引張速度3 $\mu\text{m/s}$ で引張試験を行い、40 μm 伸ばして約0.4 μN の力を検出している。さらに長谷川ら(2000)の報告した培養家兎血管平滑筋細胞の引張試験では、引張速度6 $\mu\text{m/s}$ で、伸びが25 μm のときに2.2 μN の力を検出している。

これらの引張試験の報告はすべて引張速度が異なるため、本研究の力-伸びの関係の結果と一概に比較することはできない。引張速度の影響が無視できる場合は、粘性の影響が完全に取り除かれるほどゆっくりと引張を负荷した場合と、粘性の影響が小さい初期の変形の範囲である。本実験の最も遅い引張速度は0.02 $\mu\text{m/s}$ であるがこの場合でも完全に粘性の影響を除去できているかは、判断できないため、初期の傾きで上記の引張試験の報告と比較する。本実験で得られた培養ウシ血管平滑筋細胞の力-伸び関係の初期(伸びが3 μm 以下まで)の傾きは、 $0.052 \pm 0.006 \text{ N/m}$ ($n=9$, mean \pm SEM)であった。Palmerらの心筋細胞の初期の傾きは、5 μm 伸ばした時の力は約0.3 μN であるので、約0.06 N/m となる。これは本実験で得られた傾きと非常に近い値である。Thoumineらや長谷川らの報告した結果からでは初期の傾きを求めることができないため、上記に述べた力と伸びの比から計算すると、培養線維芽細胞では約0.01 N/m 、培養平滑筋細胞では0.088 N/m となる。本実験で得られた傾きは培養線維芽細胞と比較して5倍大きい結果であった。長谷川らの培養家兎平滑筋細胞の傾きと比較すると本実験で得られた培養ウシ血管平滑筋細胞の傾きは少し小さい値を示した。この原因としては、種の違いや培養の継代数の他に、彼らの6 $\mu\text{m/s}$ という非常に速い引張速度が影響していると考えられる。

上記の引張試験の報告では応力-ひずみ関係については一切述べられていない。応力-ひずみ関係では、細胞の大きさによる影響を取り除くことができるため、力学特性をより顕著に示すことができ、得にこの傾きから弾性率を求めることができるため、他の方法で測定した弾性率と比較することができる。ピペット吸引法で求められている細胞の弾性率としては、Theretらは培養内皮細胞を計測し、約0.3 kPa と報告しており、Jonesら(1999)は培養軟骨細胞を計測し、約0.65 kPa と報告している。本研究で求めた培養ウシ血管平滑筋細胞の初期弾性率は、 $3.2 \pm 0.4 \text{ kPa}$ ($n=9$, mean \pm SEM)であり、培養内皮細胞とは約10倍、培養軟骨細胞と比較しても約5倍硬いことになる。

このように本研究で求めた培養ウシ血管平滑筋細胞の力-伸び関係の傾きや弾性率の値は、他の非筋細胞のそれと比較して非常に大きい。これは筋細胞は収縮するため非常に多くの筋フィラメントを有しており、これら原形質内の細胞骨格が細胞全体の硬さに大きく関与してからと考えられる。しかし5.1.3節でも述べたように、培養した血管平滑筋細胞は実際の生体内に存在した形質とは大きく異なっており、合成型の平滑筋細胞である。これに対し、実際の動脈中膜に存在する平滑筋細胞は収縮型であり、合成型の平滑筋細胞よりはるかに筋フィラメントが多いと予想される。ので、収縮型の平滑筋細胞の方がより硬いと考えられる。そこで次章では、収縮型と予想される酵素分散法により単離したラット胸大動脈平滑筋細胞の引張試験を行う。

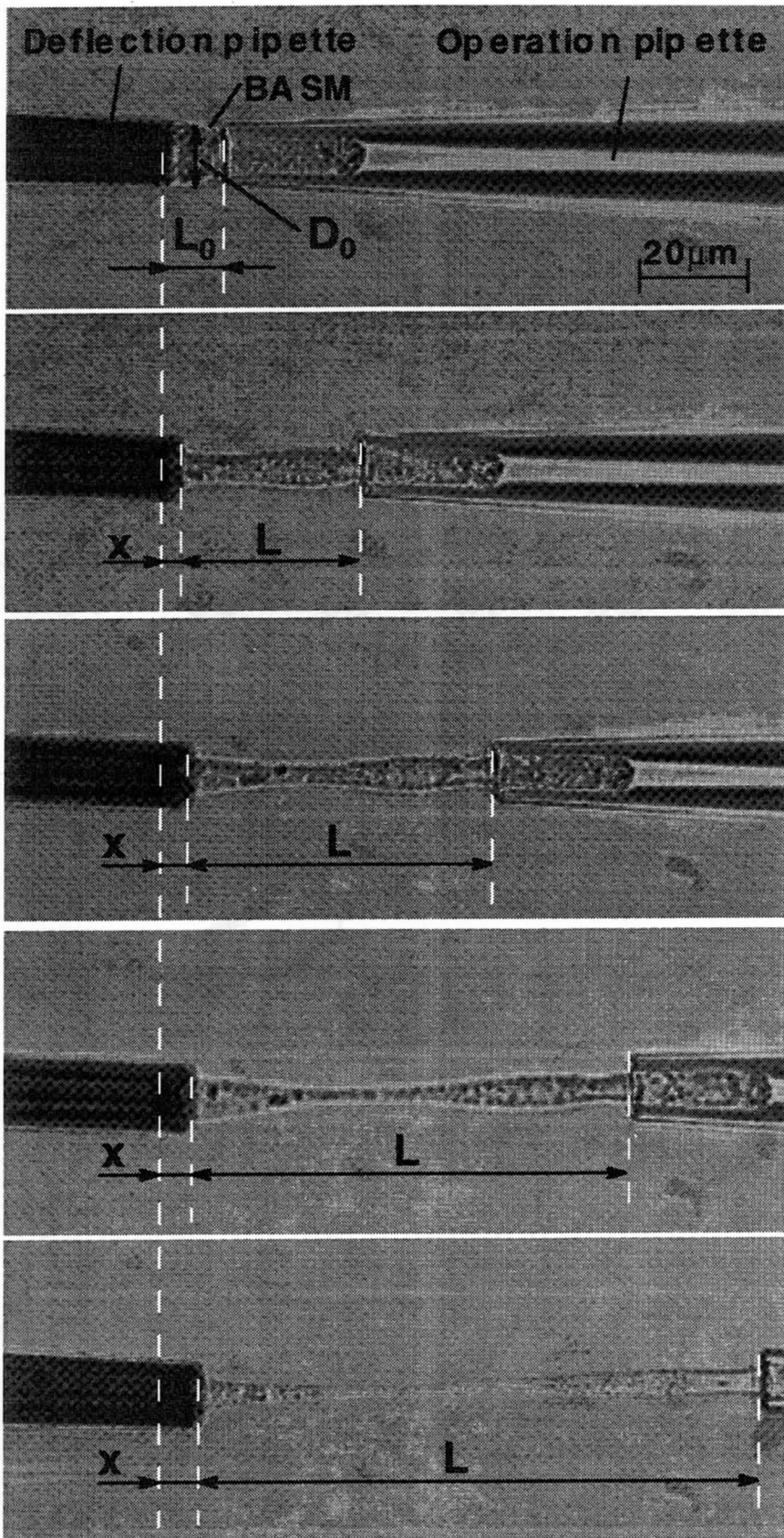
5. 研究成果

5.3 培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験

Table 5.3.1 培養ウシ平滑筋細胞の引張データまとめ

Cell no.	Initial diameter D_0 (μm)	Initial length between pipette tips L_0 (μm)	Strain rate $\dot{\epsilon}$ (%/s)	Spring constant for pipette k (N/m)	Overall elastic modulus E_{all} (kPa)	Initial elastic modulus E_{init} (kPa)
BASM1	17.5	12.2	3.4	0.038	2.2	2.3
BASM2	17.5	12.3	0.14	0.016	1.3	3.7
BASM3	20.5	14.3	0.23	0.013	1.0	3.3
BASM4	12.6	8.8	7.1	0.684	4.7	(16.1)
BASM5	19.5	13.6	0.24	0.002	1.1	1.2
BASM6	12.6	8.9	1.2	0.026	2.0	2.9
BASM7	9.5	6.7	2.9	0.182	1.4	3.3
BASM8	15.2	12.1	4.1	0.100	5.2	4.0
BASM9	18.6	13.5	11	0.380	5.8	3.0
BASM10	13.0	11.9	14	0.157	8.4	5.0
Mean	15.6	11.4	4.4	0.160	3.3	3.2
SEM	1.1	0.8	1.5	0.069	0.8	0.4

() data is not used for Initial elastic modulus.



Force F

$$F=kx$$

Elongation ΔL

$$\Delta L=L-L_0$$

Nominal stress σ

$$\sigma=F/A_0$$

$$(A_0=\frac{\pi D_0^2}{4})$$

Strain ε

$$\varepsilon=\frac{\Delta L}{L_0}$$

Elastic modulus E

$$E=\frac{\sigma}{\varepsilon}$$

Fig.5.3.1 培養ウシ血管平滑筋細胞の引張の様子

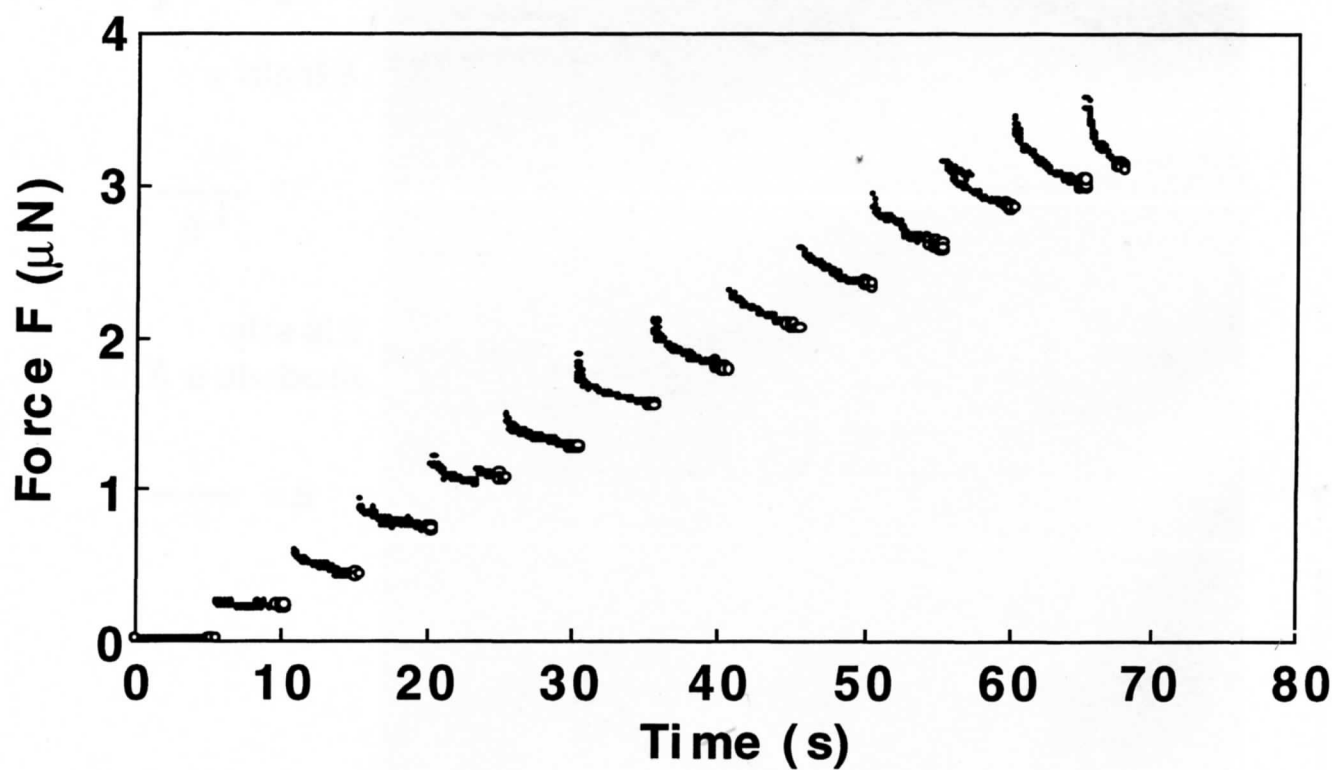
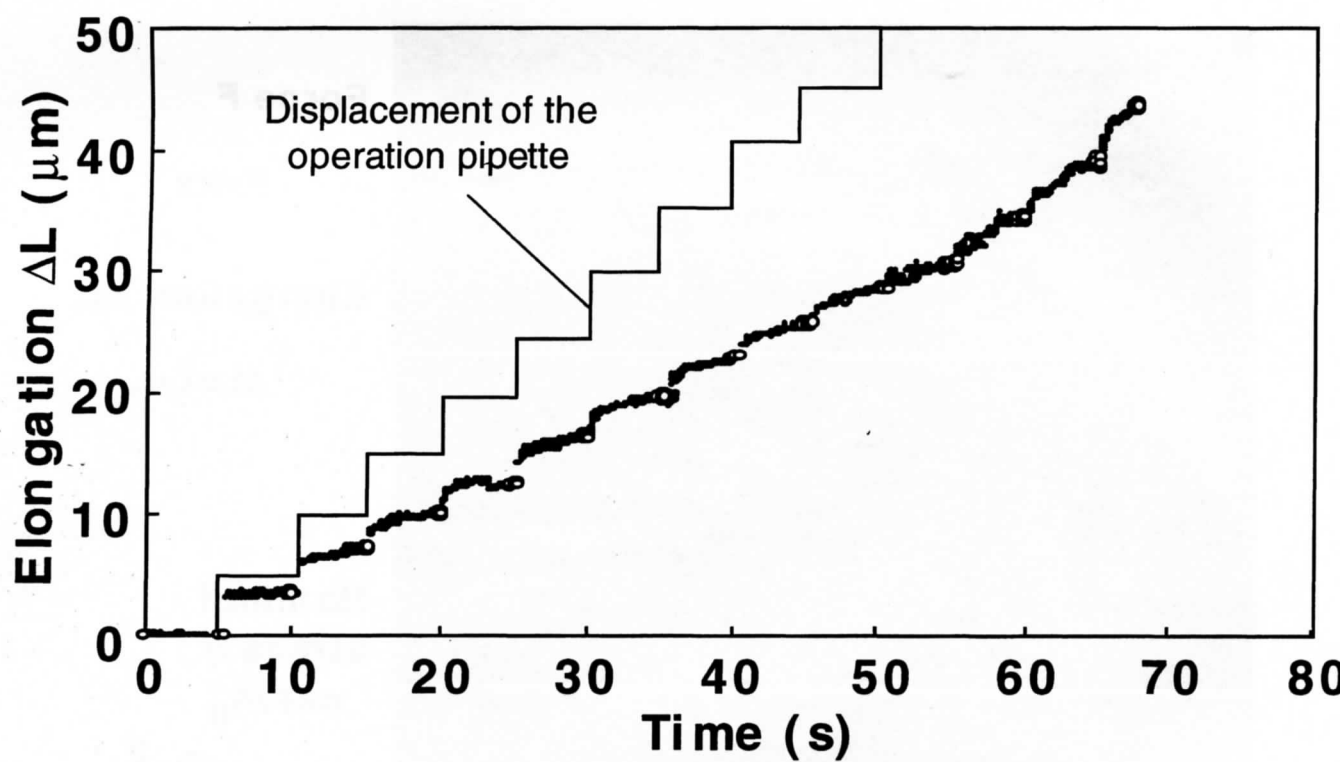


Fig.5.3.2 伸び ΔL と力 F の経時変化 (ピペット 5 μm 移動・5秒停止)

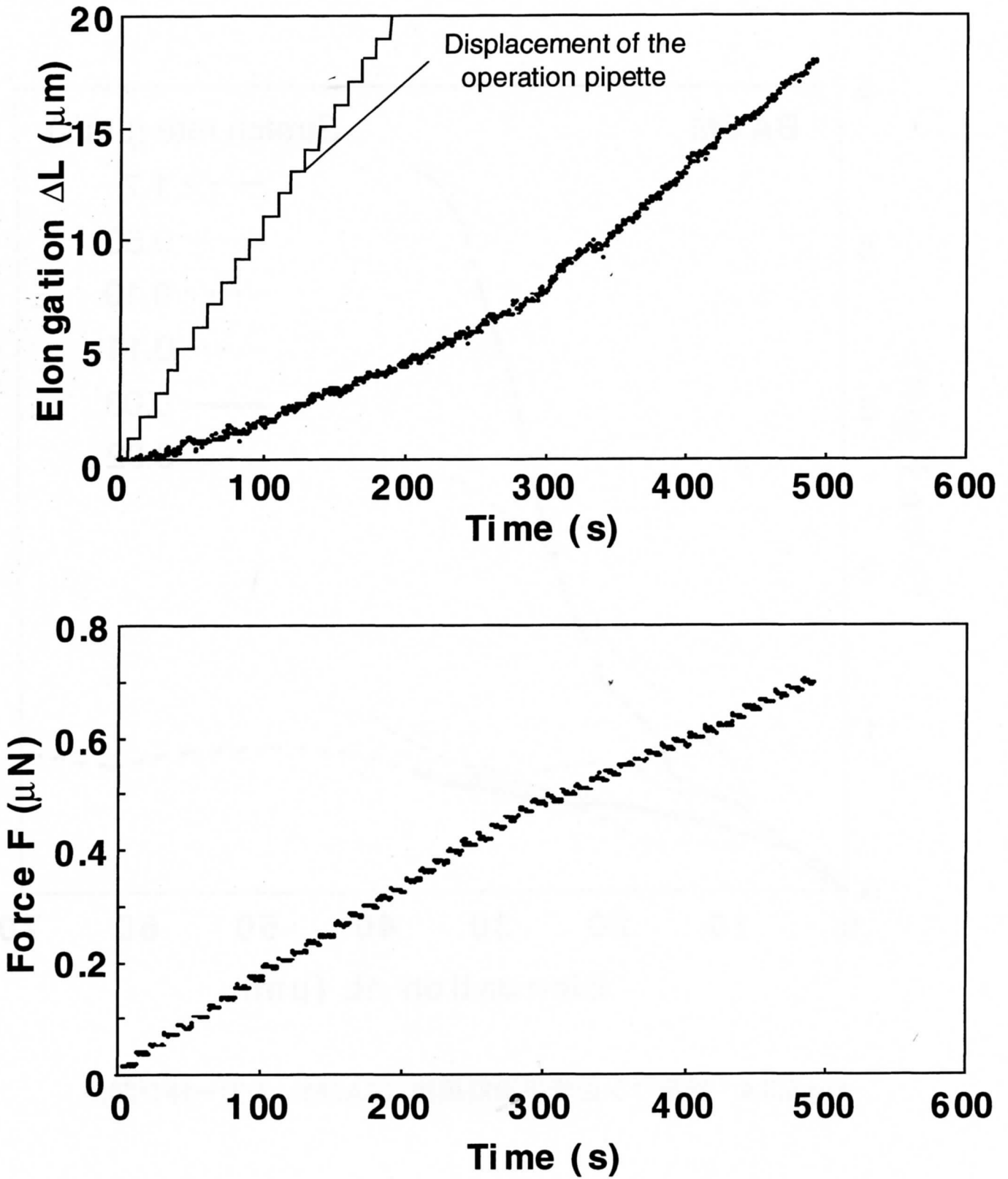


Fig.5.3.3 伸び ΔL と力 F の経時変化 (ピペット1 μm 移動・10秒停止)

5. 研究成果

5.3 培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験

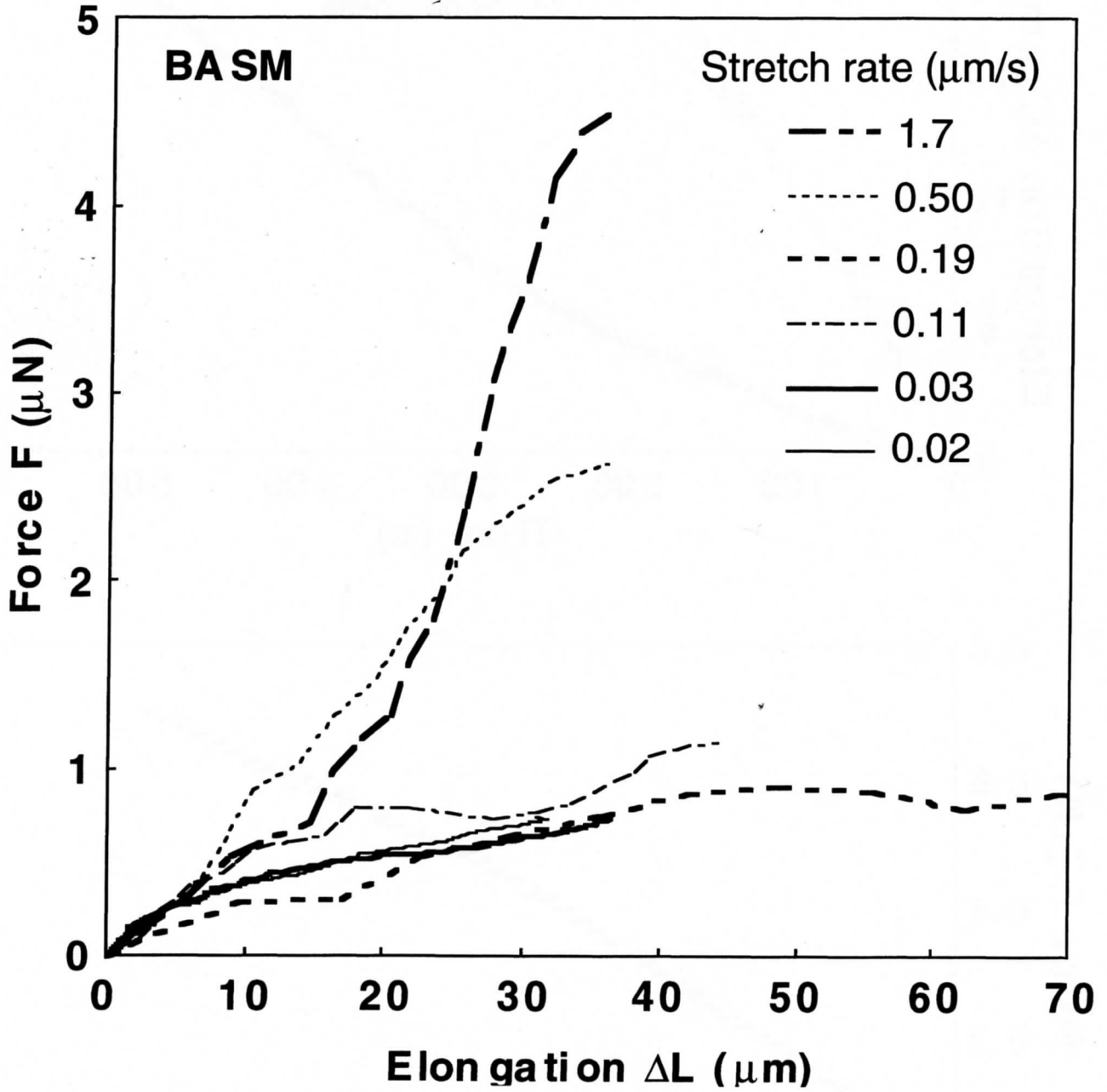


Fig.5.3.4 培養ウシ血管平滑筋細胞 (BAS M) のカー伸び関係

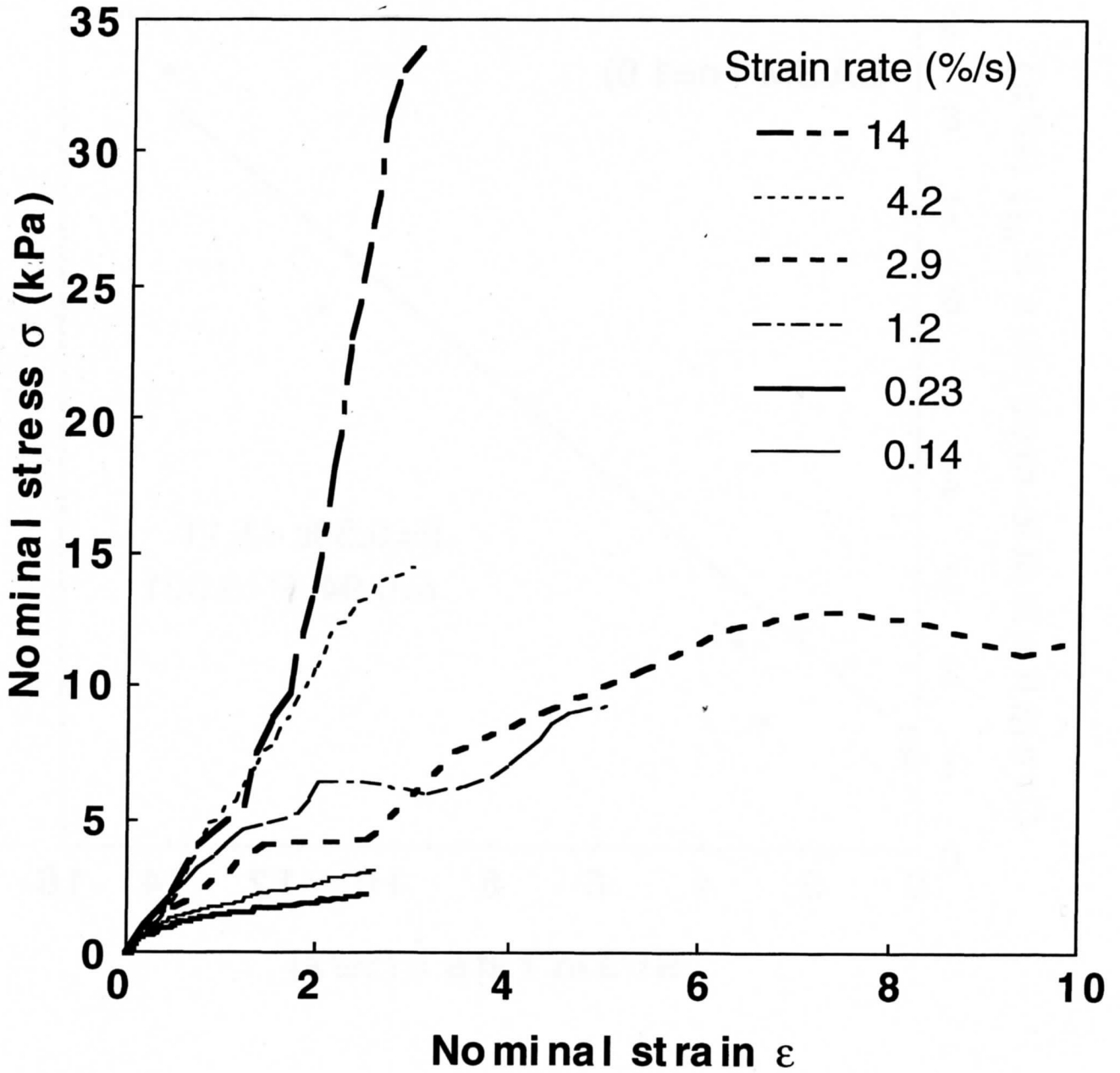


Fig.5.3.5 培養ウシ血管平滑筋細胞 (BASM) の公称応力-ひずみ関係

5. 研究成果

5.3 培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験

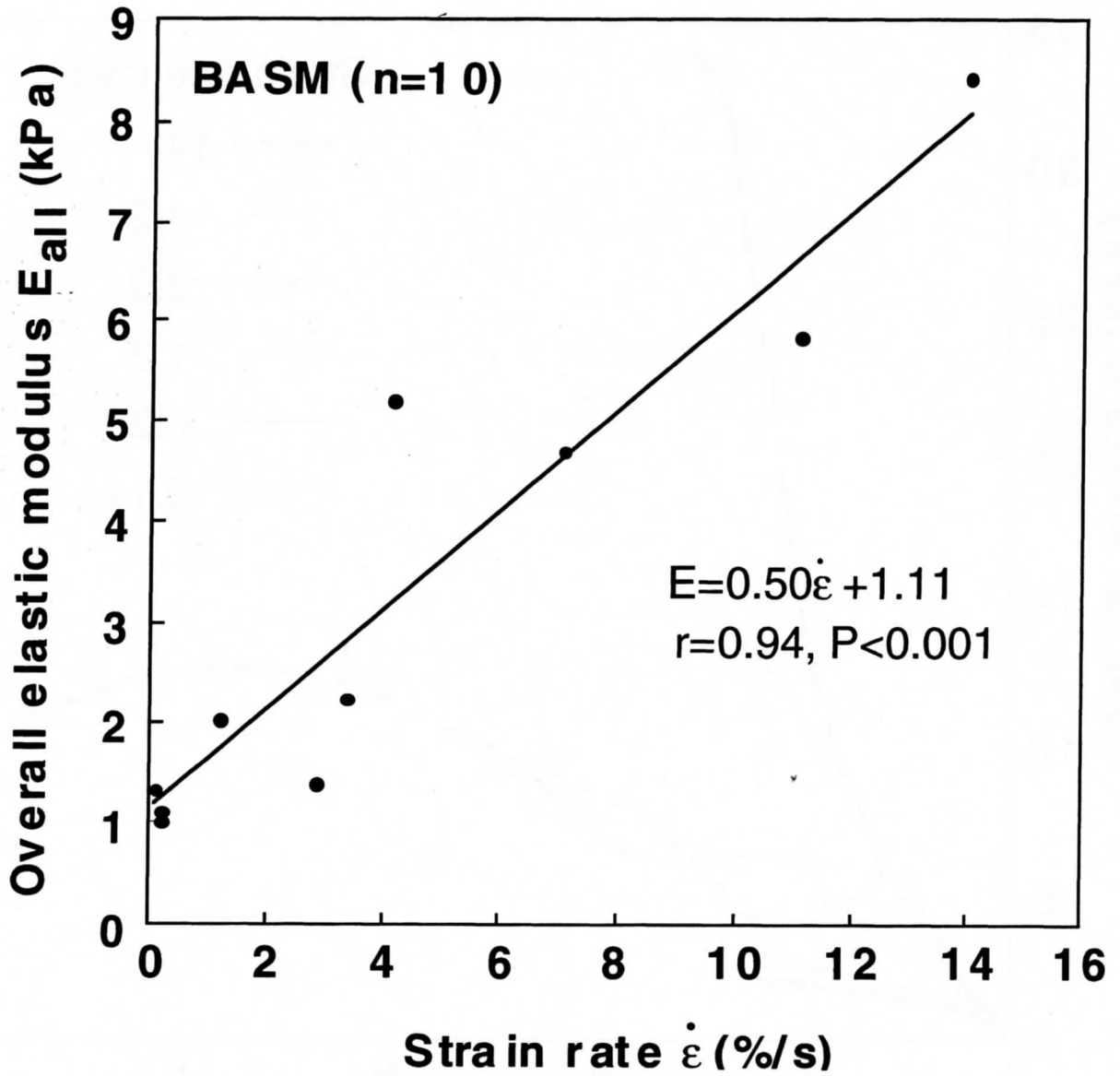


Fig.5.3.6 ひずみ速度の代表弾性率に対する影響

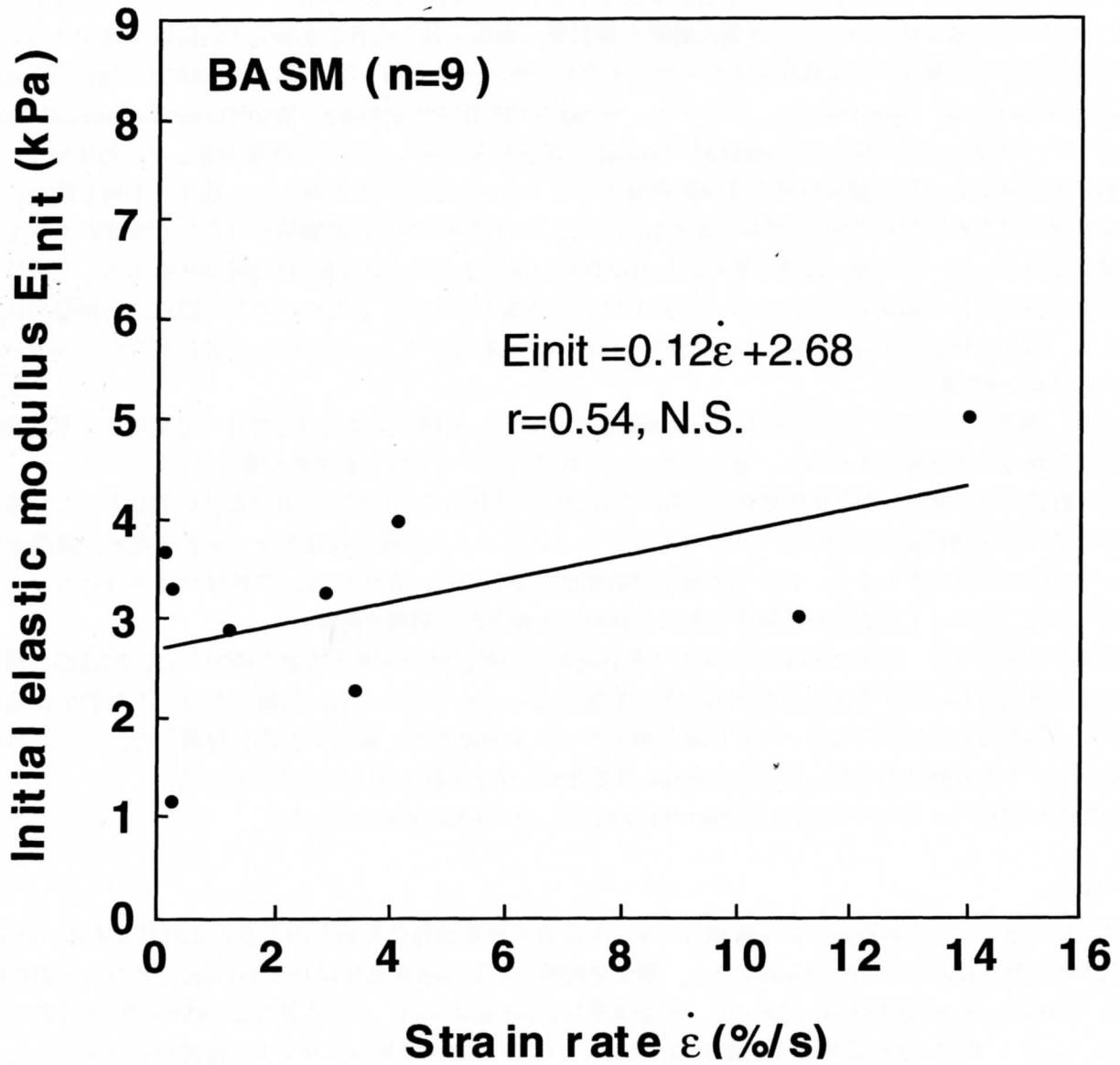


Fig.5.3.7 ひずみ速度の初期弾性率に対する影響

5. 研究成果

5.4 酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の引張試験

5.4 酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の引張試験

5.4.1 方法

酵素分散法による単離 試料には生後18~22週齢のウイスター系ラット(♂)を12匹用いた。コラゲナーゼとエラスターゼを用いて血管壁より平滑筋細胞を単離した。本法はCampbellら(1977)の方法を改良した清尾(1999)の方法を用いた。ラット胸大動脈を摘出後、血管を軸方向長さ約2cmの円筒状に輪切りにし、その中に血管を軽く伸長させる程度の太さのポリエチレンチューブを通した。続いて、HBSS 2ml (Hanks' Balanced Salt Solution, Gibco BRL)に、コラゲナーゼ2mg (TYPE III 151 units/mg, Worthington Biochemical Corp.)、エラスターゼ133 μ l (TYPE I 48.5 units/ml, Sigma)の混合溶液に浸し、37 $^{\circ}$ Cで振盪加温した。約30分後、血管を取り出し外膜および中膜の外側を実体顕微鏡下でピンセットを用いて剥離した。残りの中膜を新たに同様の混合溶液に入れて37 $^{\circ}$ Cで約1時間30分振盪加温した。この溶液には平滑筋細胞がほとんど含まれていないため使用しなかった。その後、血管を取り出し再び新たな混合溶液に入れて同様に2時間振盪加温した。以上の操作から得られた平滑筋細胞入りの混合溶液を酵素の影響を少なくするため、直ちにHBSSで3倍程度に希釈した後、37 $^{\circ}$ CのPBS(-)を8ml程度入れた直径35mmの浮遊細胞用ディッシュの中心付近にパスツールピペットを用いて約3mlを滴下した。

試験方法 装置には5.2節で述べた細胞用引張試験機を用いた。試験方法は5.3.1節で述べた培養ウシ平滑筋細胞の引張試験方法と同様であるのが、使用したマイクロピペットおよび引張速度が異なる。

酵素分散法により単離した平滑筋細胞は、実際の血管壁に存在していた時と同様に細長い形状をしている。よって培養ウシ平滑筋細胞で用いたマイクロピペットではピペット先端の直径が大きすぎるため、細胞がピペット内に吸い込まれてしまう。よって単離平滑筋細胞の場合には、直径3~8 μ mの肉厚マイクロピペットを用いた。また、ピペットで細胞を把持する際は、細胞の長軸方向の両端を把持した。

引張速度に関しては、5.3節の培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験の結果を考慮し決定した。3.2.2節で得られたひずみ速度が4%/s以下であれば代表弾性率に影響がないという結果から、単離したラット血管平滑筋細胞のひずみ速度は4%/s以下になるように引張作動ピペットを移動させ、細胞に引張を負荷した。ここでの引張作動ピペットの移動はすべて、ピペットを1 μ m移動させ5s停止を繰り返したもので行った。

用いたたわみピペットのバネ定数は0.008~0.109N/mで、平均0.042N/mであった。

5.4.2 結果

引張試験に用いた酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の長軸方向の長さはおおよそ12~45 μ m、短軸方向の長さはおおよそ6~13 μ mであり、細胞を把持した際の断面直径は10.4 \pm 0.8 μ m、ピペット間距離は22.0 \pm 4.0 μ m (n=8, mean \pm SEM)であった。引張速度は0.14 \pm 0.01 μ m/s、ひずみ速度は0.95 \pm 0.28%/sであった(Table 5.4.1)。細胞に50%程度まで引張を加えることができ、8例中2例がピペット先端部付近で破断した。それら以外はピペットから離脱した。

Fig.5.4.1に単離したラット血管平滑筋細胞の引張の一例を示す。培養ウシ血管平滑筋細胞のような球形の形状とは異なり、ピペットで把持した時点ですでに細長い形状をしている。培養ウシ平滑筋細胞と同様に、細胞の断面積は伸長された状態では一様ではなかった。破断した単離ラット平滑筋細胞の破断位置はピペット先端付近であり、この位置が局所的に細くなっていき破断に至った。

5.5.3節の培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験で得られたひずみ速度が4%/s以下であれば代表弾性率に影響がないという結果から、ひずみ速度4%/s以下で引張を負荷した培養ウシ平滑筋細胞と単離ラット平滑筋細胞の力学特性を比較する。Fig.5.4.2および4に、5.5.3節の培養ウシ血管平滑筋細胞のひずみ速度0.14~3.4%/sの力-伸び関係および公称応力-ひずみ関係を再掲し、Fig.5.4.3および5に、本章で得られた単離したラット血管平滑筋細胞の力-伸び関係および公称応力-ひずみ関係を示す。単離ラット平滑筋細胞は培養ウシ平滑筋細胞に比べ、伸びでは半分程度、ひずみでは6分の1程度しか引張を負荷できていないため、培養ウシ平滑筋細胞

で得られたようなひずみの増加に伴う傾きの減少は顕著には見られなかったが、曲線の傾きは培養ウシ平滑筋細胞と比較して急峻になっているように見受けられた。特に公称応力-ひずみ関係ではその傾向が顕著であった。しかし、単離ラット平滑筋細胞個々の全体にわたる力-伸び曲線を原点を通る直線で近似した際の傾きは $0.036 \pm 0.008 \text{ N/m}$ ($n=8$, mean \pm SEM), 培養ウシ平滑筋細胞の傾きは $0.027 \pm 0.004 \text{ N/m}$ ($n=6$, mean \pm SEM) であり両者に有意な差はなかった。力-伸び関係の伸びが $3 \mu\text{m}$ までの範囲の曲線を原点を通る直線で近似した際の単離ラット平滑筋細胞の傾きは $0.062 \pm 0.021 \text{ N/m}$ ($n=8$, mean \pm SEM), 培養平滑筋細胞の傾きは $0.048 \pm 0.008 \text{ N/m}$ ($n=6$, mean \pm SEM) であり、この場合も有意な差は見られなかった。しかしながら単離ラット平滑筋細胞個々の全体にわたる公称応力-ひずみ曲線を原点を通る直線で近似した際の傾き、つまり代表弾性率は $9.3 \pm 2.8 \text{ kPa}$ ($n=8$, mean \pm SEM) であり、培養平滑筋細胞の代表弾性率 $1.5 \pm 0.2 \text{ kPa}$ ($n=6$, mean \pm SEM) より有意に高い値を示した。また公称応力-ひずみ曲線のひずみ 0.2 までの範囲の曲線を原点を通る直線で近似した際の単離ラット平滑筋細胞の傾き、つまり初期弾性率は $12.6 \pm 3.8 \text{ kPa}$ ($n=8$, mean \pm SEM), 培養ウシ平滑筋細胞の初期弾性率 $2.8 \pm 0.4 \text{ kPa}$ ($n=6$, mean \pm SEM) より、有意に高い値を示した (Fig.5.4.6)。しかし、単離ラット平滑筋細胞の力-伸び関係の傾きや弾性率の標準誤差 (SEM) は培養ウシ平滑筋細胞の標準誤差 (SEM) と比較して非常に大きい値を示し、単離ラット平滑筋細胞の個々の細胞の力学特性のばらつきが大きかった。

Fig.5.4.7に、細胞を把持した際のピペット間距離 L_0 を初期の断面積 A_0 で割ったAspect比の弾性率に対する影響を示す。Aspect比の増加に伴い、代表弾性率および初期弾性率が増加しているように見受けられたが、有意な相関はなかった。その他の指標 (細胞断面直, , ピペット間距離, 引張速度, ひずみ速度) においても代表弾性率及び初期弾性率との間に有意な相関はなかった (Table 5.4.1)。

5.4.3 考察

酵素分散法で単離したラット血管平滑筋細胞は、培養ウシ血管平滑筋細胞のひずみ速度 $4\%/s$ 以下で引張を負荷したものと比べ、力-伸び関係の傾きは有意な差は見られなかったが、公称応力-ひずみ関係においては傾きが急峻になっており、代表弾性率及び、初期弾性率は有意に高い値を示した。ここで、力-伸び関係の傾きにおいてラット平滑筋細胞と培養ウシ平滑筋細胞に有意な差が見られなかったのは、力-伸び関係では力学特性だけでなく細胞の形状による影響も含まれるためである。このように、ラット平滑筋細胞のように細長い形状をしている細胞は伸びに対する力が小さくなるため、形状が大きく異なる細胞同士の力学特性を力-伸び関係で比較することはできないと考えられる。

単離ラット血管平滑筋細胞が培養ウシ平滑筋細胞と比較して有意に高い弾性率を示したことは、当初の考え通り、生体の動脈中膜に存在する収縮型の平滑筋細胞は収縮を行うために、培養した合成型の平滑筋細胞に比べ、より多くの筋フィラメントを有していることに起因すると考えられる。また、筋フィラメントの量だけではなく、筋フィラメント配列方向も合成型の平滑筋細胞に比べ高い弾性率に影響しているとも考えられる。骨格筋細胞や心筋細胞の収縮はアクチンフィラメントとミオシンフィラメントの滑りで行われることが明らかになっているが、平滑筋細胞の収縮にアクチンフィラメントとミオシンフィラメントがどのような機構で働くのかは、ほとんど分かっていない。平滑筋細胞の主な収縮は細胞の長軸方向に起こるため、筋フィラメントは細胞の長軸方向に多く配列していると考えられる。よって平滑筋細胞の長軸方向と短軸方向では長軸方向の方が高い弾性率を示すと考えられるが現在のところ明らかではない。故に短軸方向でも引張試験を行うことにより、収縮型の平滑筋細胞と合成型の平滑筋細胞との筋フィラメントの配列の違いを評価することができ、平滑筋細胞の収縮機構を解明できると考えられる。

しかしながら、今回引張試験に用いたラット平滑筋細胞の収縮能の有無は確認していない。酵素分散法により単離した場合は収縮型の平滑筋細胞を得ることができるが、酵素の影響を受けるためすべての平滑筋細胞に収縮能があるわけではない。清尾 (1999) による報告によると酵素分散法により単離したラット平滑筋

5. 研究成果

5.4 酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の引張試験

細胞の約60%が収縮を示す結果となっている。細長い形状の平滑筋細胞の方が収縮を示し易いが、細長い形状でも収縮を示さない細胞も存在する。収縮型の定義にもよるが、たとえ収縮能がなくても酵素分散法により単離した平滑筋細胞は、合成型の細胞とは異なり、形状は細長く、より多くの筋フィラメントを有していると考えられる。よって今回引張試験した単離ラット平滑筋細胞が収縮能のない細胞であっても合成型とはまったく異なったフェノタイプであると考えられる。

単離ラット平滑筋細胞引張試験の結果は、培養ウシ平滑筋細胞の結果と比較して個々の細胞による個体差が非常に大きかった。培養細胞はその培養環境が同じであるため、個々の細胞の特性は非常に類似しており、個体差が小さく、扱いやすいため広く研究に用いられている。この点から培養ウシ平滑筋細胞の個体差が単離ラット平滑筋細胞と比較して小さいのは当然と考えられる。これに対し、本研究で用いたラット血管平滑筋細胞は、生体内に存在していた血管壁から単離した直後の細胞であり、個体差が大きい原因には様々な要因が考えられる。細胞の形状による影響も考えられたが、Fig.5.4.7のAspect比の弾性率に対する影響では有意な相関は認められなかった。よって他の要因としては、大きく分けて二つ上げられる。一つは、生体内の血管壁に存在していた状態で個々の平滑筋細胞に大きな個体差があったこと、もう一つは、酵素により血管壁から単離されていく過程及びその後の時間経過により個体差が生じたことである。

まず、前者の生体内で存在した個々の平滑筋細胞に個体差があったという考えについて考察する。1.1でも述べたように生体組織は力学的環境の影響によりリモデリングする。血管壁では血圧による影響により血管壁内の平滑筋細胞がリモデリングし、血管壁内の応力、ひずみ分布を一様に行っている。この血圧を受けている状態では内膜側の平滑筋細胞と外膜側の平滑筋細胞とでは、その形状や特性は異なると考えられる。本研究で用いた、酵素分散法により単離した平滑筋細胞は、血管中膜の内膜側に存在したか、外膜側に存在したかは判断できない。ゆえに、上記の個体差が内膜側の平滑筋細胞と外膜側の平滑筋細胞による影響とも考えられる。

次に後者の、酵素処理及び時間経過による影響を考察する。酵素処理により平滑筋細胞を単離する際、平滑筋細胞が単離された後も酵素溶液に浸されていると、酵素によりダメージを受け、形状が球形になり細胞膜が薄くなっていく。ゆえに、酵素によるダメージの有無により細胞の個体差が生じる。次に時間経過による影響であるが、血管から単離された平滑筋細胞は時間が経過するにつれ細胞膜が不安定になっていき、突起物が出てくる。このような現象は培養平滑筋細胞を用いた際にも現れたが、培養平滑筋細胞に比べ速く細胞膜の変化が起こる。これは上記にも述べたように、生体内では血圧および細胞外マトリックスによる力学的影響を受け、これによりリモデリングをしていた平滑筋細胞が、単離されたことにより上記の力学的因子が解放されたため、何らかの変化をしていると推測されるが、この時間経過による形態の変化が力学特性に大きな影響を与えていると考えられる。本実験で行った単離ラット平滑筋細胞の引張試験は、酵素処理により単離された後、3時間以内に行った。この3時間の間にも力学特性は変化していると考えられ、単離後早期に試験したものと晩期に試験したものでは力学特性が異なると推測される。引張試験を行った単離ラット平滑筋細胞のRASM2, RASM3, RASM4のデータは単離後1時間以内に試験したものであり、RASM5, RASM6, RASM7のデータは単離後2~3時間経過した後に試験したものである。単離後早期に実験を行ったものは、力-伸び関係、公称応力-ひずみ関係の傾きが急峻であり、高い弾性率を示している。これに対し、単離後2~3時間で試験したものは3例中2例が破断している。特に破断を示した2例の破断応力は約2.5kPaであり、破断荷重においては0.4 μ Nにも至っていない。Glerumらはブタの膀胱とヒトの子宮から単離した細長い形状の平滑筋細胞の破断荷重をそれぞれ約54 μ N及び約46 μ Nと報告しており、本研究で破断した血管平滑筋細胞の破断荷重の100倍以上である。このことから酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の個体差の主たる原因は単離後の時間経過によるものと考えられる。

今回行った単離ラット平滑筋細胞の引張試験では伸びでは15 μ m程度、ひずみでは50%程度しか引張を負荷できていない。これは酵素分散法で単離した平滑筋細胞では引張試験を行う際、いくつかの困難な点が存在

することによる。まず第1に、細胞が細長い形状であるため把持することが難しいことがあげられる。細胞を把持する際、細胞の長軸方向の端ではなくそこからずれた位置で把持したり、細胞がピペット内に過度に吸い込まれることがあった。また他端を把持して細胞を持ち上げる際、垂れ下がりやよじれを起こすことが多く、たわみピペットでもう一方の他端を把持することが困難な場合が多かった。本実験に用いた中で最も細長いものでも長軸方向が約45 μm であった。第2に、酵素処理した溶液に存在する微細なゴミが問題となる。このゴミは血管を酵素により溶かした際に溶け残る組織であると考えられるが、これらがピペットに付着し、細胞との接着力を悪化させている。本実験ではこれらのゴミを最小限にするため、酵素処理した溶液を滴下し、必要以上に酵素液が入らないようにした。フィルター処理による細胞の回収も試みたが、細胞の回収率が悪かったため、使用しなかった。今後、より良い細胞の回収方法を検討する必要があると考えられる。第3に、細胞膜の変化があげられる。上述したように酵素や時間経過により細胞膜が劣化している場合があり、このような細胞をピペットで吸引すると細胞膜が破れ、細胞内原形質がピペット内に侵入してくるため把持できなかった。

以上のように単離ラット平滑筋細胞の引張試験について考察した結果、今後の課題が明らかになった。最も重要なことは、いかに引張試験を行うまでの時間を短縮するかである。まず、酵素処理して平滑筋細胞を単離する時間を短くし、さらに早期に単離された酵素によるダメージの少ない細胞を用いて、早急に引張試験を行う。これにより、より生体内に存在した血管平滑筋細胞に近い細胞の力学特性を計測することができると考えられる。

Table 5.4.1 単離ラット平滑筋細胞の引張データのまとめ

Cell no. (Breaking)	Initial diameter D_0 (μm)	Initial length between pipette tips L_0 (μm)	Aspect ratio L_0/D_0	Strain rate ϵ (%/s)	Spring constant of pipette k (N/m)	Overall elastic modulus E_{all} (kPa)	Initial elastic modulus E_{init} (kPa)	Time for preparation (hour)
RASM1	11.9	11.9	1.0	0.92	0.036	4.3	5.8	1~2
RASM2	11.4	34.6	3.0	0.23	0.039	27.1	38.4	~1
RASM3	11.9	24.7	2.1	0.61	0.030	9.2	10.0	~1
RASM4	10.1	19.8	2.0	0.86	0.082	7.5	9.5	~1
<u>RASM5</u>	12.6	12.8	1.0	1.48	0.109	3.5	9.0	2~3
RASM6	9.1	39.7	4.4	0.25	0.016	11.6	11.6	2~3
<u>RASM7</u>	5.8	25.9	4.4	0.62	0.016	8.5	12.5	2~3
RASM8	10.8	6.9	0.6	2.61	0.006	2.5	4.3	1~2
mean	10.4	22.0	2.3	0.95	0.042	9.3	12.6	
SEM	0.7	4.0	0.5	0.28	0.013	2.8	3.8	

5. 研究成果

5.4 酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の引張試験

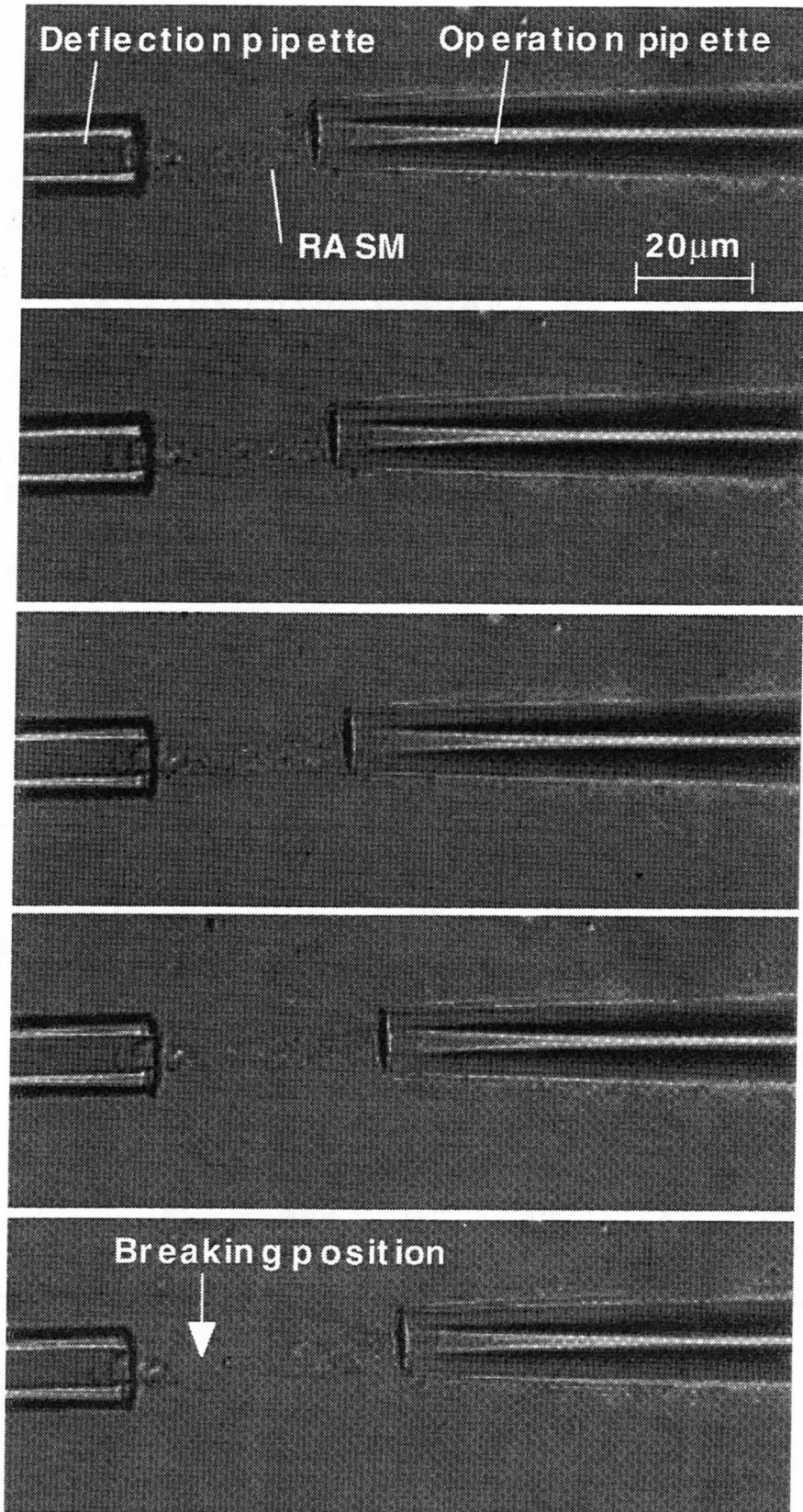


Fig.5.4.1 単離ラット血管平滑筋細胞の引張の様子

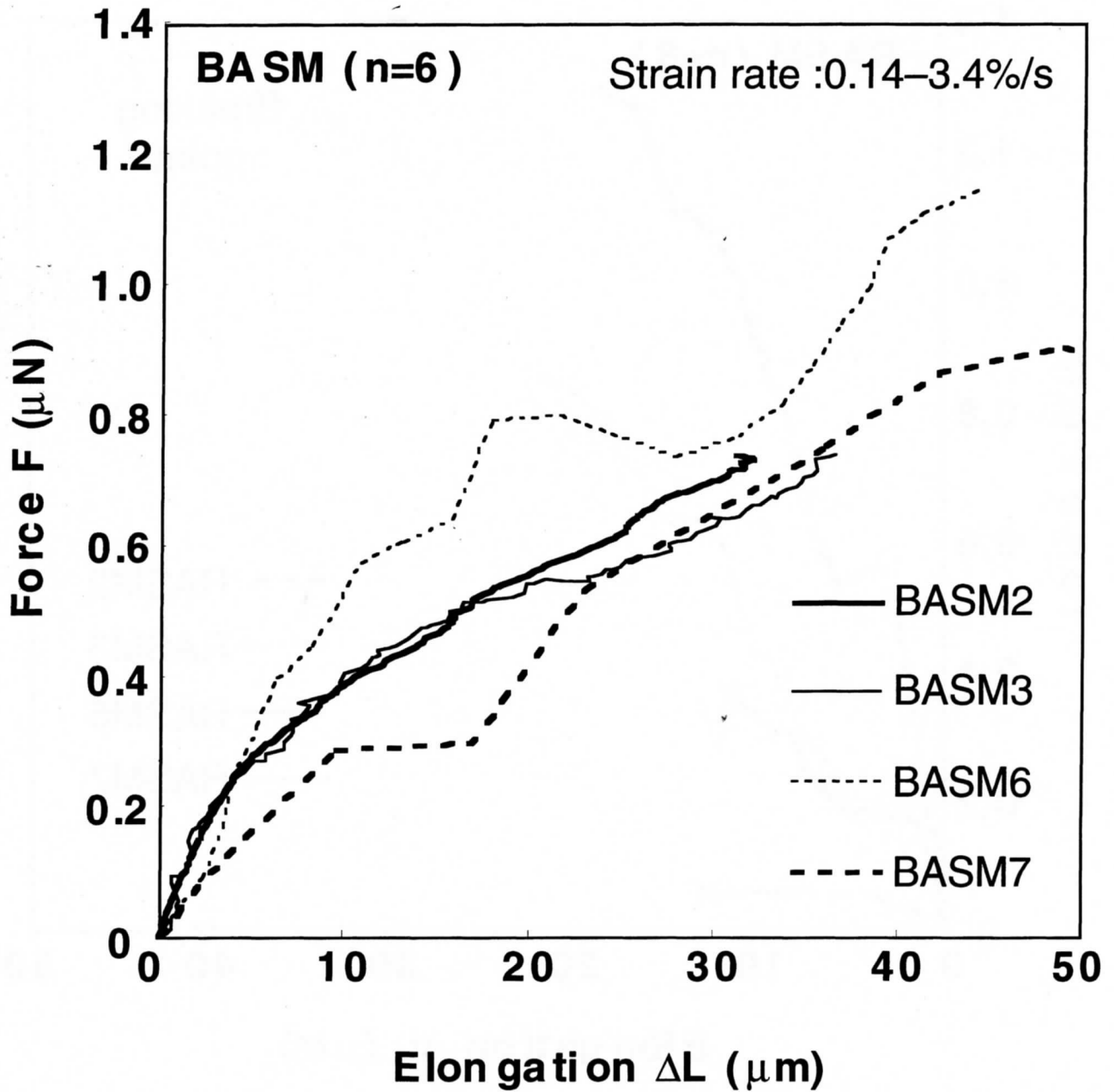


Fig.5.4.2 培養ウシ血管平滑筋細胞の力-伸び関係 (ひずみ速度4%/s以下)

5. 研究成果

5.4 酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の引張試験

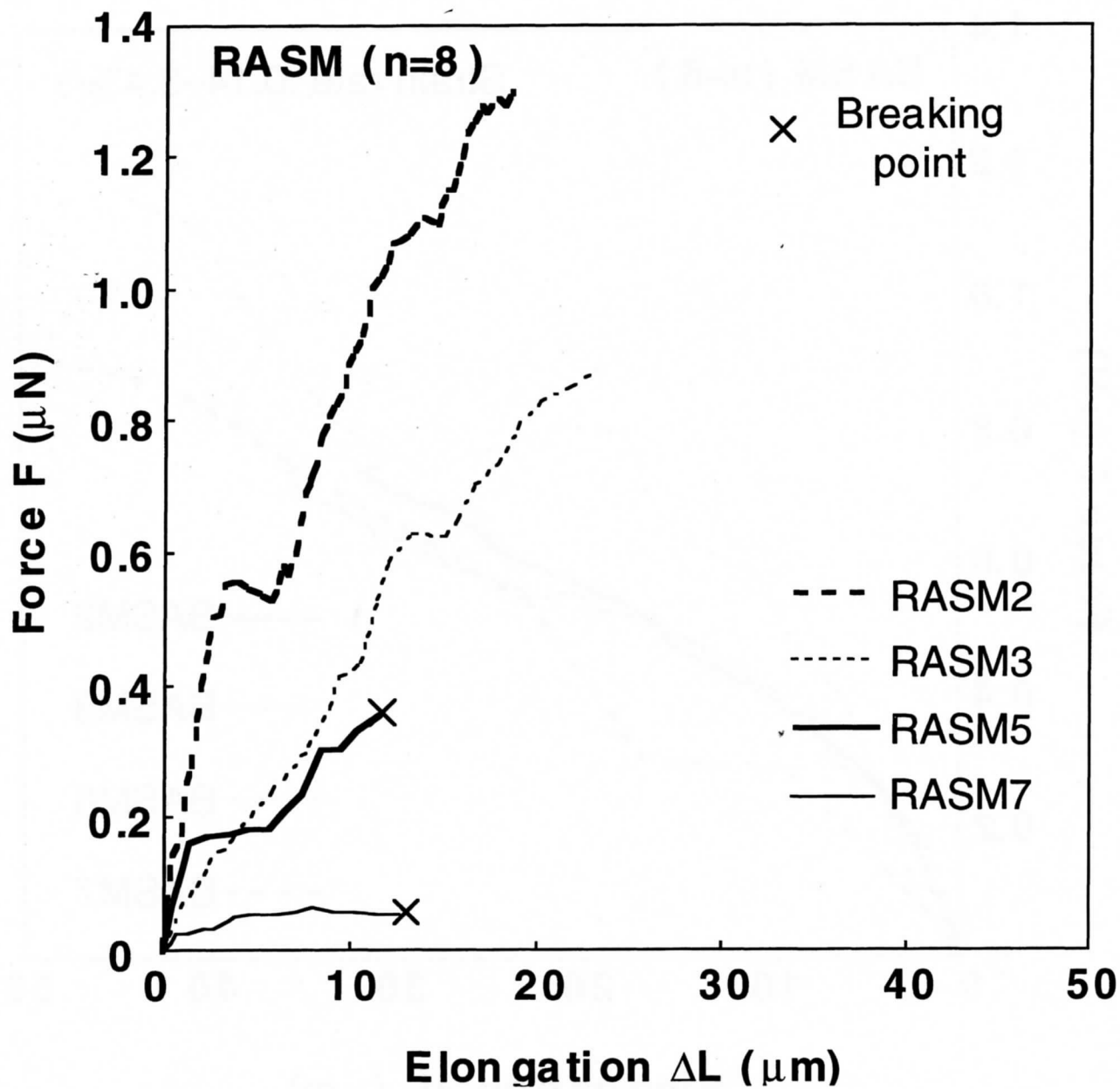


Fig.5.4.3 単離ラット血管平滑筋細胞 (RASM) のカー-伸び関係

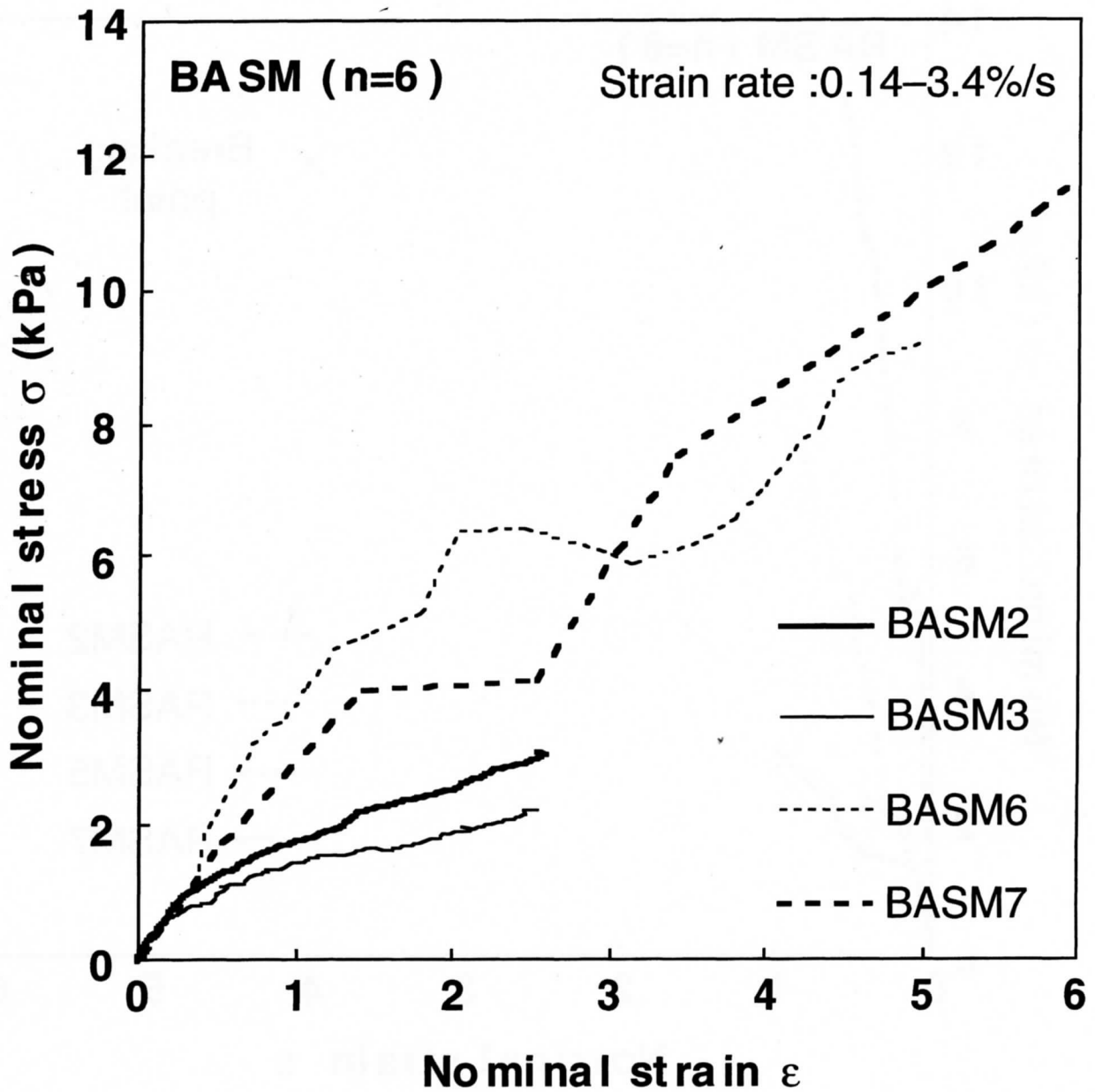


Fig.5.4.4 培養ウシ血管平滑筋細胞の公称応力-ひずみ関係
(ひずみ速度4%/s以下)

5. 研究成果

5.4 酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の引張試験

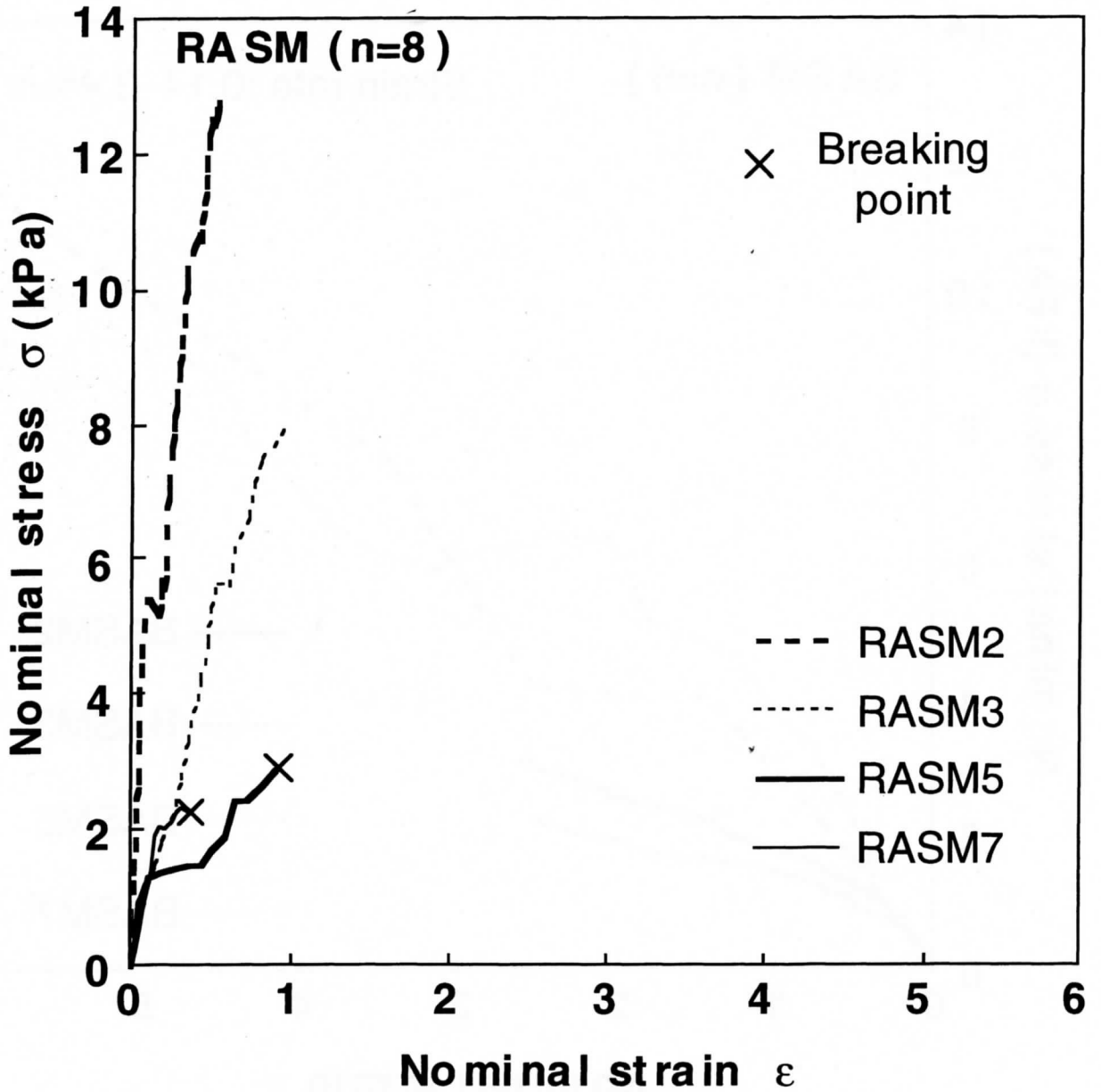


Fig.5.4.5 単離ラット血管平滑筋細胞の公称応力-ひずみ関係

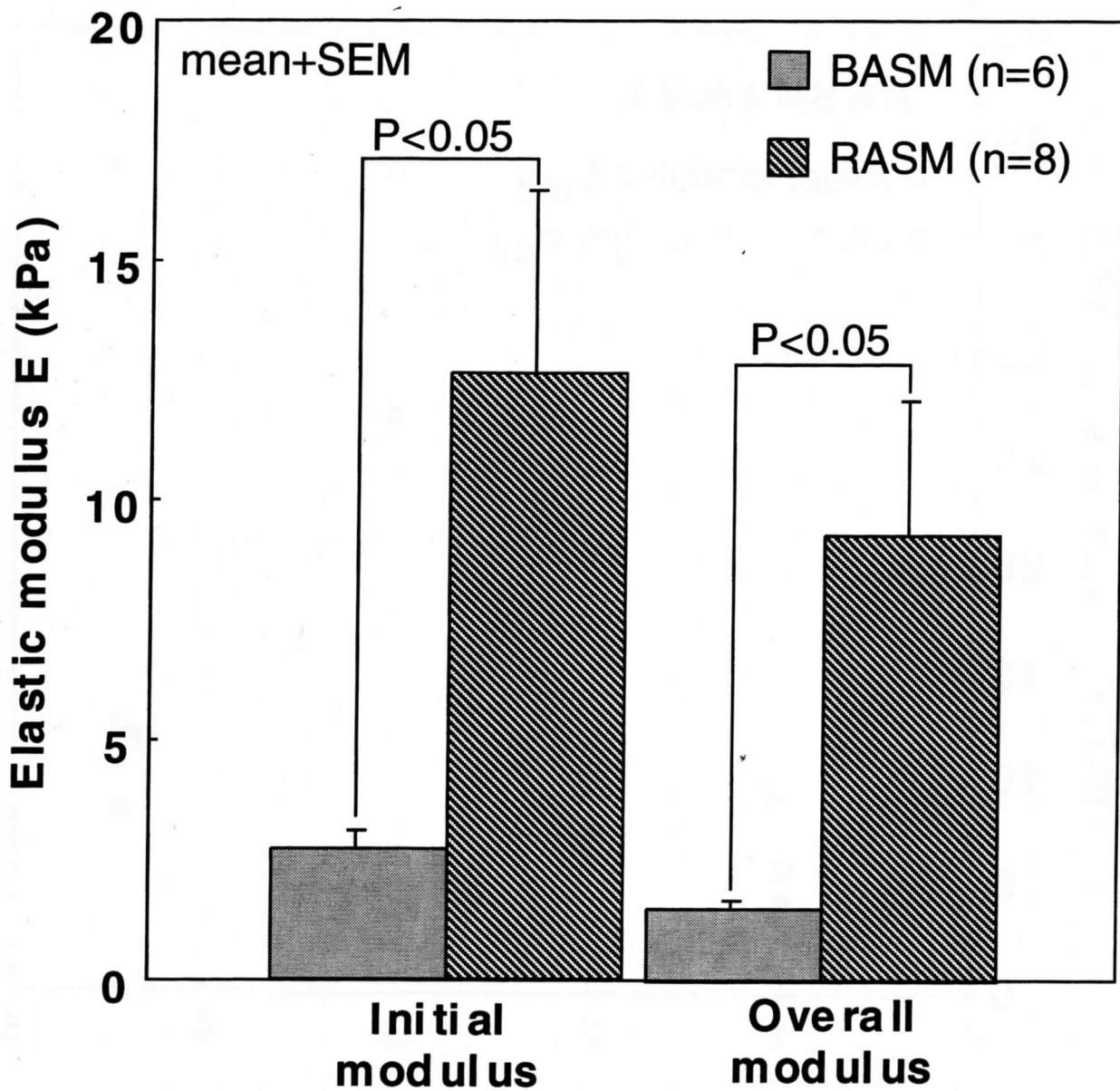


Fig.5.4.6 培養ウシ及び単離ラット血管平滑筋細胞の初期, 代表弾性率

5. 研究成果

5.4 酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞の引張試験

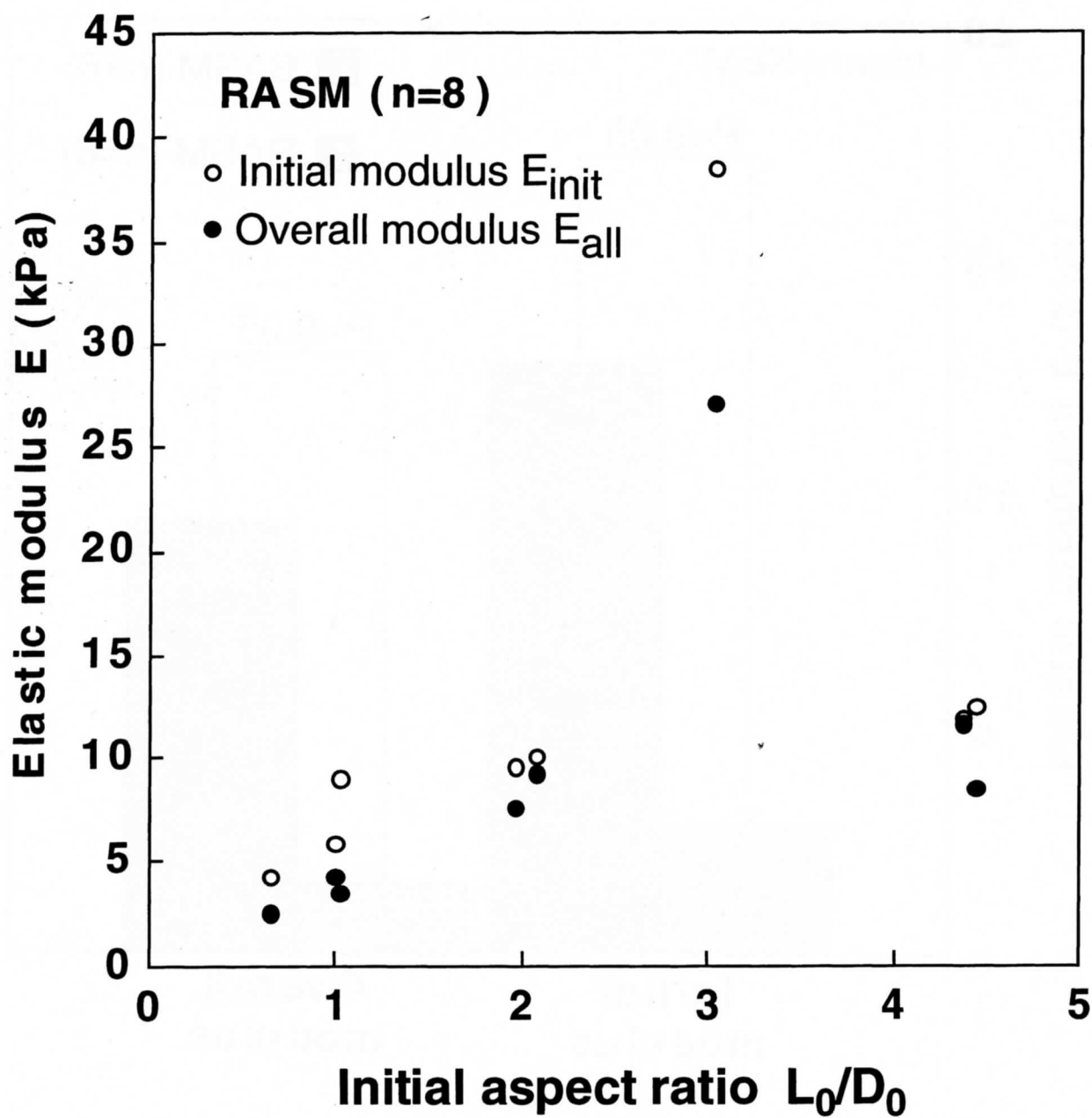


Fig.5.4.7 単離ラット血管平滑筋細胞のアスペクト比-弾性率関係

5.5 粘弾性特性の解析

細胞が一般的に粘弾性的性質を持つことは広く知られている。しかし、その種々の細胞の持つ粘弾性的性質が生体内でどのような役割をになっているかは、殆ど明らかになってはいない。特に平滑筋細胞のような筋細胞ではその弾性的性質が主に研究されており、粘弾性的性質に関する報告は殆どない。このような筋細胞の持つ粘弾性的性質が、その収縮特性にどのような影響を及ぼしているかというのは非常に興味深いことである。本章では、5.3節の培養ウシ血管平滑筋細胞の引張試験で得られた、粘弾性的特性をもとに3要素固体モデルを用いて解析し、培養ウシ血管平滑筋細胞の粘弾性特性を評価した。

5.5.1 方法

培養ウシ平滑筋細胞の粘弾性特性を弾性ばねと粘性ダッシュポットからなるKelvinモデル (Fig.5.5.1) によって評価した。Kelvinモデルの構成方程式は次式で与えられる。

$$\sigma + \tau_\epsilon \dot{\sigma} = E_R(\epsilon + \tau_\sigma \dot{\epsilon}) \quad (1)$$

ここで、

$$\tau_\epsilon = \frac{\eta}{E_1}, \quad \tau_\sigma = \frac{\eta}{E_0} \left(1 + \frac{E_0}{E_1}\right), \quad E_R = E_0$$

である。式(1)にひずみ入力にランプ入力、 $\epsilon=at$ ($a=\text{const}$) を代入し、ラプラス変換を行い整理すると、

$$L\sigma(s) = E_R \alpha \left[\frac{1}{s^2} - \frac{\tau_\epsilon}{s} + \frac{\tau_\epsilon}{s + 1/\tau_\epsilon} + \frac{1}{s} \left(\frac{\tau_\sigma/\tau_\epsilon}{s + 1/\tau_\epsilon} \right) \right] \quad (2)$$

となる。これを逆ラプラス変換することにより、ひずみ入力 $\epsilon=at$ における応力の時間応答が得られ、

$$\sigma(t) = E_R \alpha \left[t + (\tau_\sigma - \tau_\epsilon) \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau_\epsilon}\right)\right) \right] \quad (3)$$

となる。これに $t = \epsilon/a$ を代入し、新たに $\sigma(\epsilon/a)$ を $\sigma(\epsilon)$ とおくと、

$$\sigma(\epsilon) = E_R \left[\epsilon + \alpha(\tau_\sigma - \tau_\epsilon) \left(1 - \exp\left(-\frac{\epsilon}{\tau_\epsilon \alpha}\right)\right) \right] \quad (4)$$

となり、ひずみ入力 $\epsilon=at$ のときの応力応答をひずみ ϵ の関数で表すことができる。この式(4)を培養ウシ血管平滑筋細胞の実験データでフィッティングし、係数 τ_ϵ , τ_σ , E_R を求めた。フィッティングは、実験で得られた Fig.5.3.5 の公称応力-ひずみ関係におけるそれぞれの実験データと式(4)の残差二乗和が最小となるようにして行い、定数 a にはフィッティングする実験データのひずみ速度を代入した。ひずみ速度の異なる10例すべての実験データでフィッティングを行い、10例それぞれの係数 τ_ϵ , τ_σ , E_R を求めた。

5.5.2 結果

求めた係数 τ_e , τ_o , E_R , および E_0 , E_1 , η をTable 5.5.1に示す。上記のパラメータのうち、 τ_o と E_1 にはひずみ速度との間に有意な相関があった ($p < 0.05$)。それ以外のパラメータにはひずみ速度との間に有意な相関はなかった。 τ_e は一定のひずみに対する応力の時定数、 τ_o は一定の応力に対するひずみの時定数であり、 E_R は粘性要素が完全に緩和した際の弾性率である。それぞれの平均値は164s, 1149s, 0.55kPaであった。

Fig.5.5.2にTable 5.5.1の係数 τ_e , τ_o , E_R の平均値を用いて求めた代表的なひずみ速度におけるモデルの公称応力-ひずみ関係を示す。非常に遅いひずみ速度の典型的な例としてひずみ速度0.001%/sの例を載せた。応力-ひずみ関係はひずみの増加に伴い、粘性の影響を受け傾きが減少している。ひずみ速度が遅いものほど小さいひずみで粘性の影響が現れてきている。粘性が完全に緩和した際の傾きは E_R であり0.55kPaとなる。Fig.5.5.2に示すようにひずみ速度が0.001%/sの場合、曲線はほぼ傾き E_R の直線とみなすことができた。

Fig.5.5.3に式(4)をひずみ ϵ で微分して得られる増分弾性率 $d\sigma/d\epsilon$ とひずみ量の関係を示す。 $\epsilon=0$ のときの増分弾性率はひずみ速度に依らず一定の値となり、これが理論上の初期弾性率となる。この値は3.84kPaであり、最も高い増分弾性率を示した。ひずみが増加するに従い、増分弾性率は指数関数的に減少していきやがて粘性要素が完全に緩和したときの弾性率 E_R となり、その値は0.55kPaとなる。増分弾性率の減少は、ひずみ速度が遅いものほど著しい。ひずみ速度0.001%/sの場合では $\epsilon=0$ のときには理論上の初期弾性率3.84kPaを示すがひずみが0.01の時にはすでに、粘性要素が完全に緩和したときの弾性率0.55kPaとなった。ひずみ速度が0.5%/s以下の曲線は図の範囲で粘性要素が完全に緩和したときの弾性率の値に到達している。

Fig.5.5.4に式(4)をひずみ ϵ で微分して得られる増分弾性率とひずみ速度の関係を示す。ひずみ ϵ には0, 1, 2, 3, 4, 5を用いた。 $\epsilon=0$ の理論上の初期弾性率はひずみ速度による影響を受けない。ひずみが0でない場合は、ひずみ速度が遅いものほど粘性要素が完全に緩和したときの弾性率0.55kPaに近い増分弾性率を示し、ひずみ速度が速いものほど初期弾性率3.84kPaに近づく。またひずみ量が大きい時の方が引張速度の増分弾性率に対する影響が小さい。

Fig.5.5.5にひずみ量の代表弾性率に対する影響を示す。この代表弾性率は、5.3.3節、5.4.3節で求めた代表弾性率と同様の計算方法で求めた。即ち、この代表弾性率は、Fig. 5.5.2の応力-ひずみ曲線のひずみが0から ϵ までの範囲の部分、原点を通る直線で近似した際の傾きである。ひずみ速度にはFig.5.5.3と同様に実験で行ったひずみ速度ならびに0.001%/sを用いた。曲線の挙動はFig.5.5.3の増分弾性率と類似しているが、増分弾性率と比較して、粘性要素が完全に緩和したときの弾性率に落ち着くには大きなひずみが必要であった。

Fig.5.5.6にひずみ速度の代表弾性率に対する影響を示す。Fig.5.5.5のデータの横軸をひずみからひずみ速度に変換したものである。この場合もFig.5.5.4に示した増分弾性率とひずみ速度の関係の曲線に類似しており、ひずみ速度が遅いものほど粘性要素が完全に緩和したときの弾性率に値を示し、ひずみ速度が速いものほど初期弾性率3.84kPaに近づいている。5.3.2節、5.4.2節で示した実験で求めた初期弾性率は公称応力-ひずみ関係の $\epsilon=0.2$ までの範囲の曲線の傾きから求めた。よってFig.5.5.6に示した $\epsilon=0.2$ の曲線は培養ウシ平滑筋細胞の初期弾性率の理論的な挙動となる。5.3.2節ではひずみ速度と $\epsilon=0.2$ までの範囲で求める初期弾性率には有意な相関はなかったが、理論的挙動ではひずみ速度が遅くなると $\epsilon=0.2$ までの範囲の曲線の傾きで求める初期弾性率は低下する結果となった。これは実験においてひずみ速度の範囲が狭かったことも関係していると考えられる。

理論上の初期弾性率を実験で得られた公称応力-ひずみ関係から求めることは不可能である。しかし、実験で得られた培養ウシ平滑筋細胞の $\epsilon=0.2$ までの範囲の曲線の傾きで求めた初期弾性率は 3.2 ± 0.4 kPa ($n=9$, mean \pm SEM)であり、理論上の初期弾性率は3.84kPaであった。ここで実験で得られた初期弾性率と理論上の初期弾性率との差は20%程度であり、実験で得られる公称応力-ひずみ関係の $\epsilon=0.2$ までの傾きを求めることでおよそその初期弾性率を見積もることができた。

5.5.3 考察

細胞の粘弾性特性に関する報告としては、赤血球 (Hochmuth et al, 1979), 白血球 (Schmid-Schönbein et al, 1981), 内皮細胞 (Sato et al, 1990), 線維芽細胞 (Thoumine et al, 1997) などがあるが, 互いに計測方法および解析方法が異なるため上記の細胞と5.2で解析した培養ウシ血管平滑筋細胞を比較することは困難であり, 解析に用いたモデルの各パラメータ値を直接比較することはできない。しかし, 時定数は計測方法や解析に用いるモデルに依存しないと考えられるため, 5.5.2節で求めた時定数 τ_e は, 上記で報告されている時定数と比較することができる。上記の細胞の時定数は, 赤血球では0.1~0.13s, 白血球では0.65s, 内皮細胞では130s, 線維芽細胞では40sと報告されている。本研究で得られた培養ウシ血管平滑筋細胞の一定のひずみに対する応力の時定数 τ_e は164sであり, 上記の報告より高い値を示した。このことから培養ウシ血管平滑筋細胞は5.3節で明らかになったように弾性率が高く, 筋フィラメントなどの弾性要素が非常に多いにも関わらず, 細胞膜や細胞質などによる粘性の影響も非常に大きいことが明らかになった。

モデルを用いたことにより粘性要素が完全に緩和した際の弾性率および理論的な初期弾性率が明らかになった。粘性要素が完全に緩和した際の傾きは0.55kPaであり, 理論的な初期弾性率は3.84kPaとなった。本研究では5.3節の培養ウシ血管平滑筋細胞, 5.4節の単離ラット平滑筋細胞の力学特性の評価方法として, 公称応力-ひずみ関係のひずみ0.2までの曲線を原点を通る直線として近似した際の傾きから, 初期弾性率を, また公称応力-ひずみ関係の全体にわたる曲線に同様の近似を施して代表弾性率を求め, これらを力学特性評価の指標とした。しかし, より正確に力学特性を表す指標は上記の粘性要素が完全に緩和した際の弾性率および初期弾性率である。初期弾性率に関しては5.2で述べたように公称応力-ひずみ関係の $\epsilon=0.2$ までの傾きを求めることで理論的な初期弾性率に近い値を得ることができる。しかし, 全体にわたる曲線の傾きから求めた代表弾性率では, 粘性要素が完全に緩和した際の弾性率に関する情報をほとんど有していない。本章でモデルを用いて解析した結果, 粘性要素が完全に緩和した際の弾性率を明確に反映しているパラメータが明らかになった。そのパラメータは公称応力-ひずみ曲線の増分弾性率である。Fig.5.5.3に示した増分弾性率-ひずみの関係によればひずみ速度0.24, 0.23, 0.13%/sの増分弾性率はひずみが2程度で, 粘性要素が完全に緩和した際の弾性率0.55kPaの値を示している。これはひずみ速度約0.24%/sで200%程度細胞に引張を加えればその時の増分弾性率が粘性要素が完全に緩和した際の弾性率を表していることになる。Fig.5.3.5に示した培養ウシ血管平滑筋細胞の公称応力-ひずみ関係によれば, ひずみ速度0.24%/sの曲線は細胞に80%程度しか引張を加えられないが, ひずみ速度0.23, 0.13%/sの曲線では細胞に250%程度引張を加えている。故に, この二つの曲線からは粘性要素が完全に緩和した際の弾性率を計測できると考えられる。ひずみ速度0.23, 0.13%/sの公称応力-ひずみ関係のひずみが2~2.4の範囲の曲線を直線で最小二乗法により近似し, 傾きを求めるとひずみ速度0.23%/sの増分弾性率は0.55kPa, ひずみ速度0.14%/sの増分弾性率は0.86kPaとなり, 粘性要素が完全に緩和した際の弾性率0.55kPaと非常に近い値を示した。また, ひずみ速度0.23%/sおよび0.13%/sでフィッティングした際の粘弾性パラメータ E_r はTable 5.5.1よりそれぞれ, 0.50kPaおよび0.79kPaでありそれぞれの増分弾性率と近い値を示した。よって, 培養ウシ血管平滑筋細胞の場合は, ひずみ速度が0.25%/s以下で細胞に引張を負荷し, 200%程度細胞を引張ることができれば, 公称応力-ひずみ関係のひずみ2以降の範囲で曲線の傾きを計測すれば, 即ち, 増分弾性率を求めれば, 粘性要素が完全に緩和した際の弾性率を計測できると考えられる。しかしながら, これは培養ウシ血管平滑筋細胞の場合であるため, 他の細胞でも上記と同じ条件で粘性要素が完全に緩和した際の弾性率を計測できるかは判断できないが, 培養ウシ平滑筋細胞より時定数の小さい細胞であれば, 粘性の影響が小さくなるため, 培養ウシ平滑筋細胞よりひずみ速度が速く, ひずみが小さくても, 粘性要素が完全に緩和した際の弾性率を計測できると考えられる。

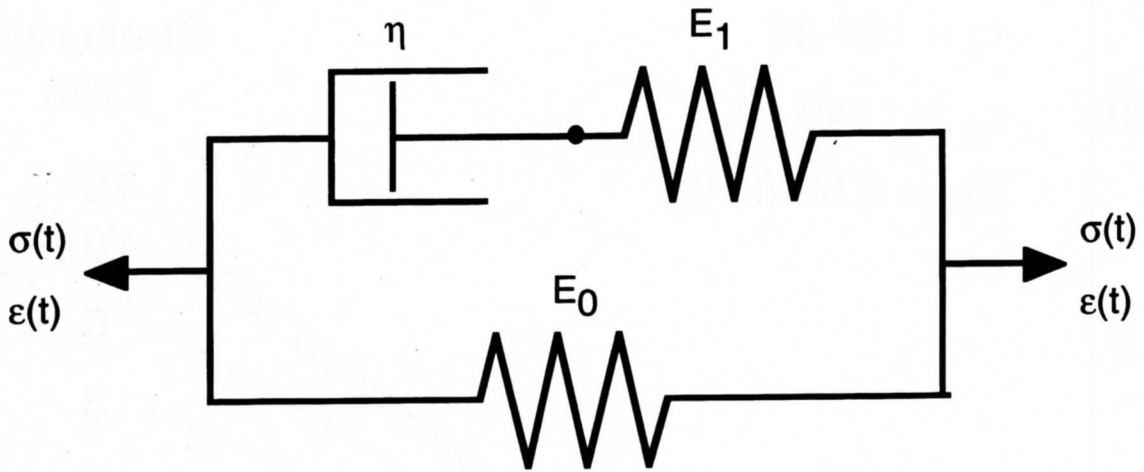
単離ラット平滑筋細胞の引張試験では十分なひずみを加えられなかったため, 粘性の影響が観察されず, モデルを用いた解析は行えなかった。培養ウシ平滑筋細胞とは粘弾性特性が異なると考えられるため, 今後単離ラット平滑筋細胞のモデルによる評価も必要と考えられる。

5. 研究成果

5.5 粘弾性特性の解析

Table 5.2.1 培養ウシ血管平滑筋細胞の粘弾性パラメータ

Strain rate (%/s)	τ_{ϵ} (s)	τ_{σ} (s)	$E_R = E_0$ (kPa)	E_1 (kPa)	η (kPa s)
14	117	1915	0.48	7.36	861
11	112	1463	0.47	5.62	629
7.1	84	874	0.50	4.71	395
4.2	106	1456	0.47	5.94	629
3.4	388	1106	0.79	1.47	570
2.9	110	788	0.47	2.88	317
1.2	100	1015	0.52	4.80	480
0.24	336	892	0.50	0.83	278
0.23	107	877	0.50	3.60	385
0.14	184	1106	0.79	3.97	731
Mean	164	1149	0.55	4.11	527
SEM	34	113	0.04	0.64	60



E_0 and E_1 , moduli of elasticity
 η , coefficient of viscosity
 $\sigma(t)$, stress
 $\varepsilon(t)$, strain

Kelvin model

Fig.5.5.1 Kelvin モデル

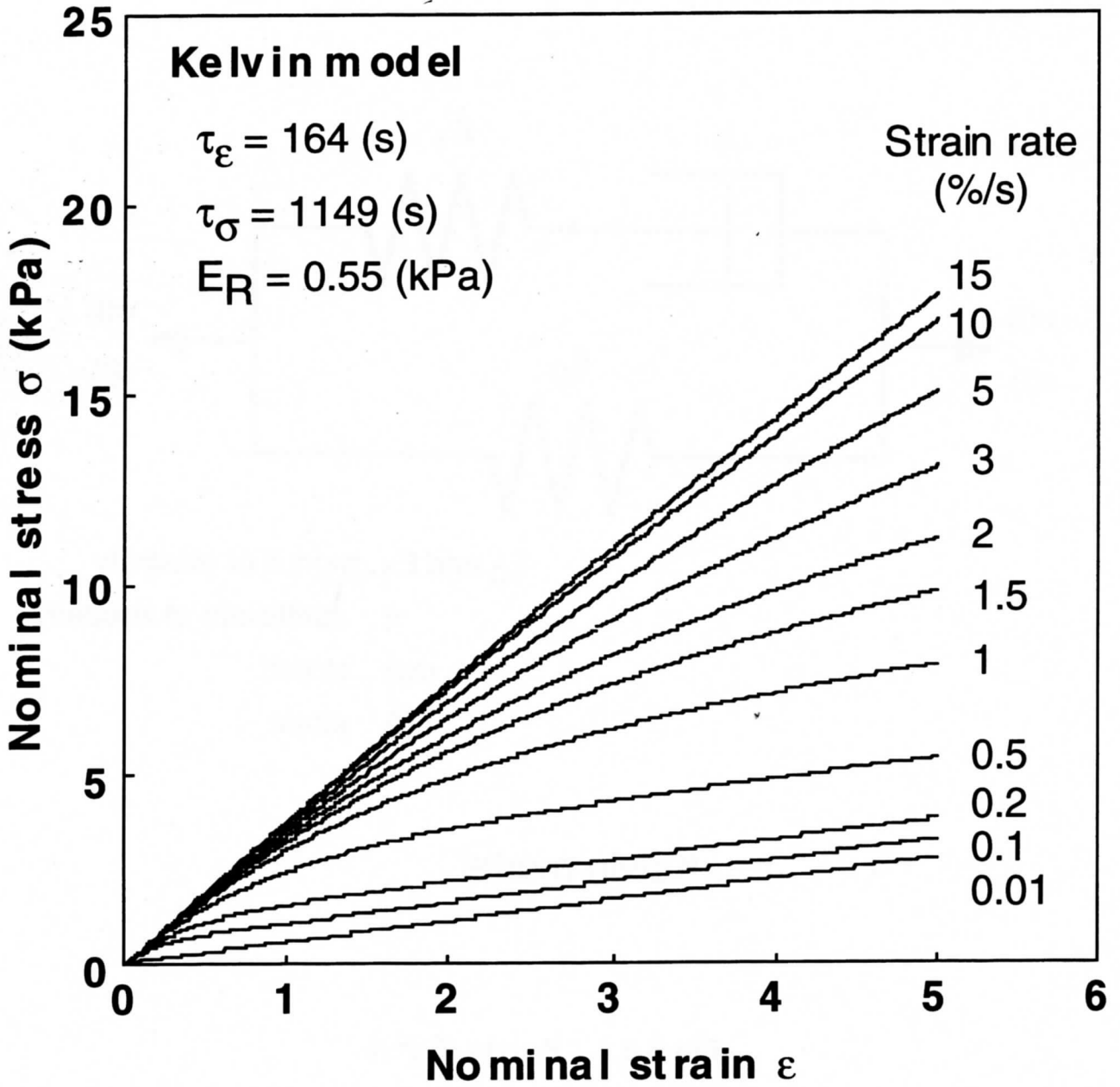


Fig.5.5.2 Kelvinモデルの応力-ひずみ関係

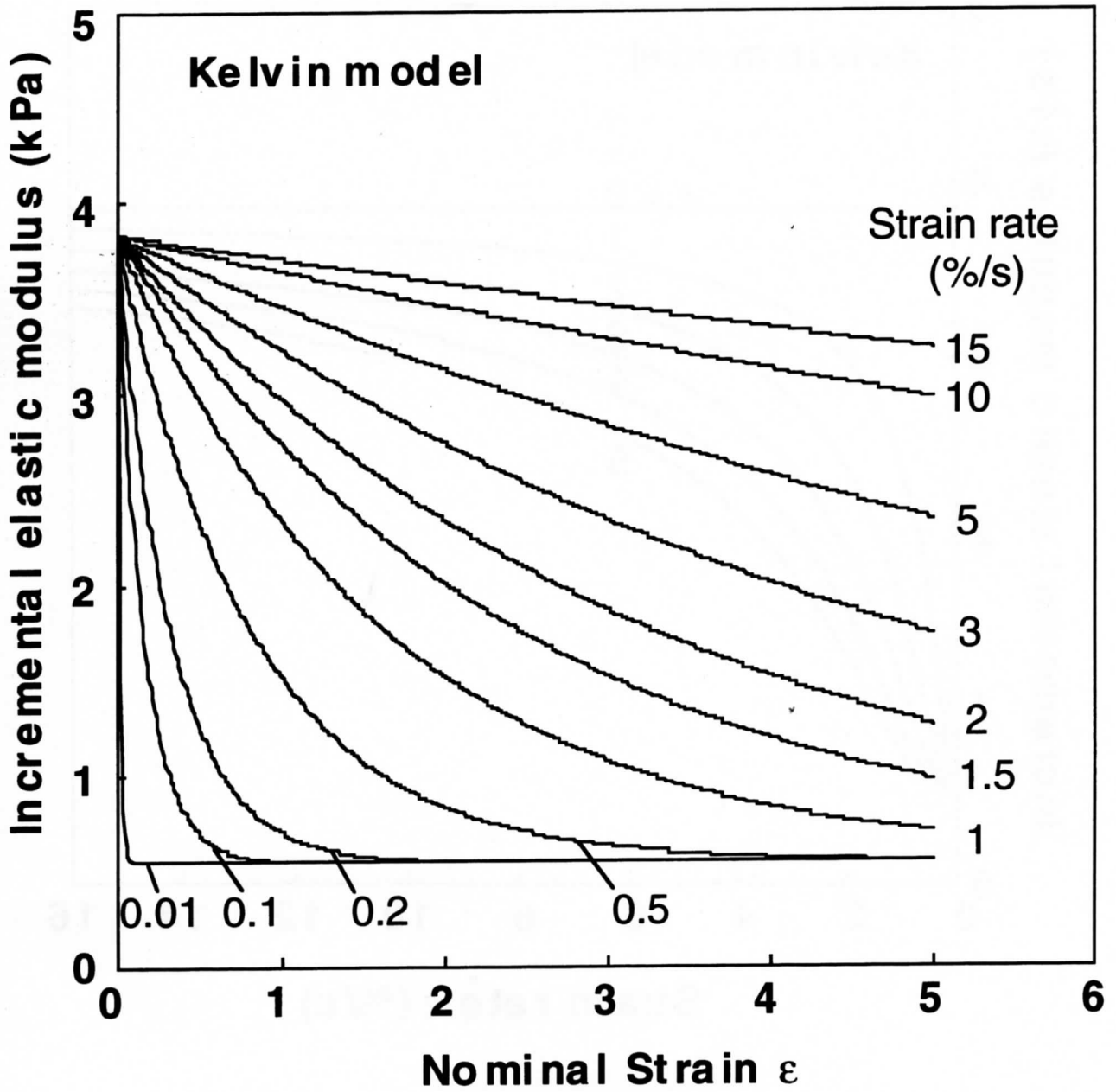


Fig.5.5.3 Kelvinモデルの増分弾性率-ひずみ関係

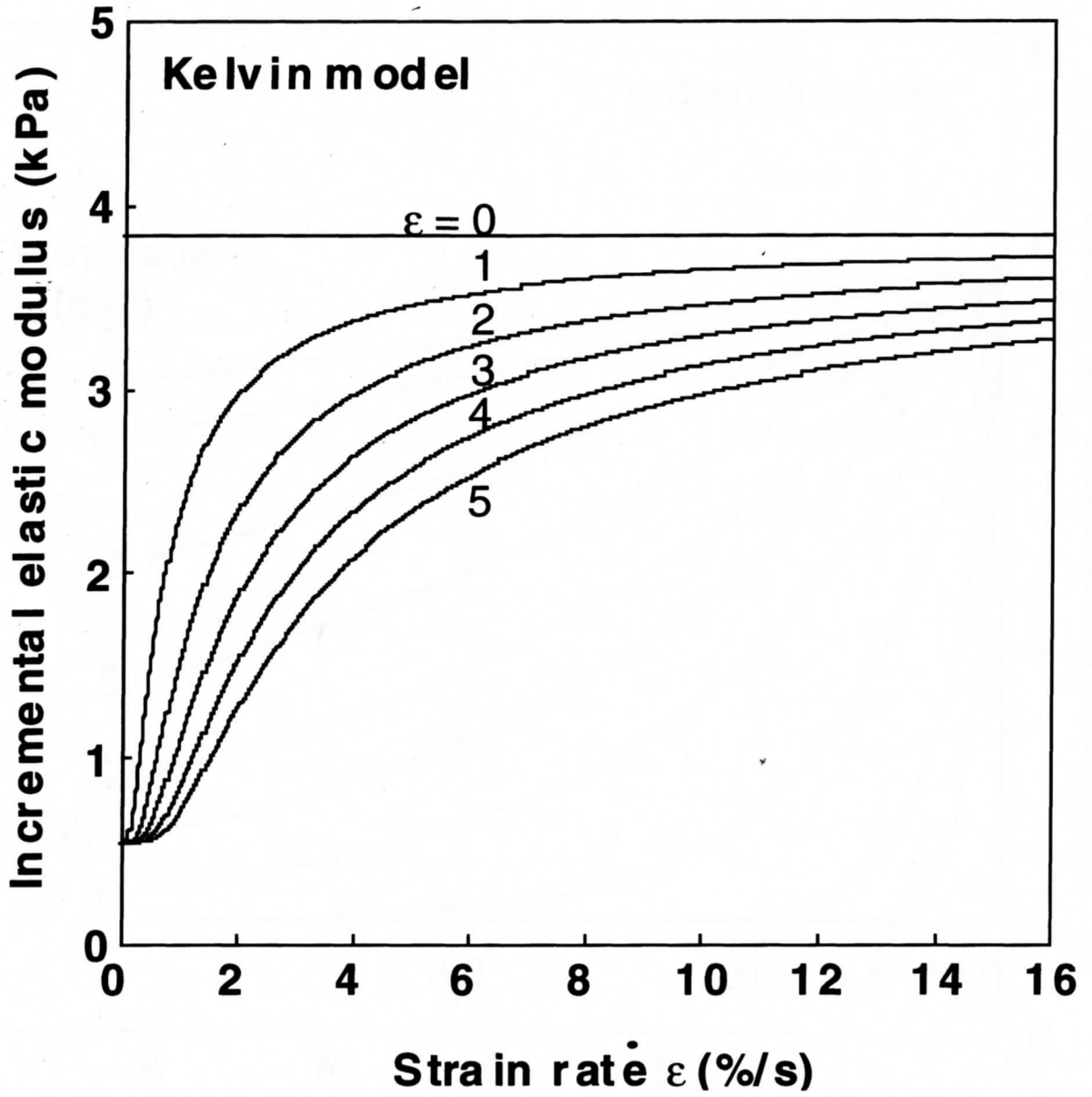


Fig.5.5.4 Kelvinモデルの増分弾性率—ひずみ速度関係

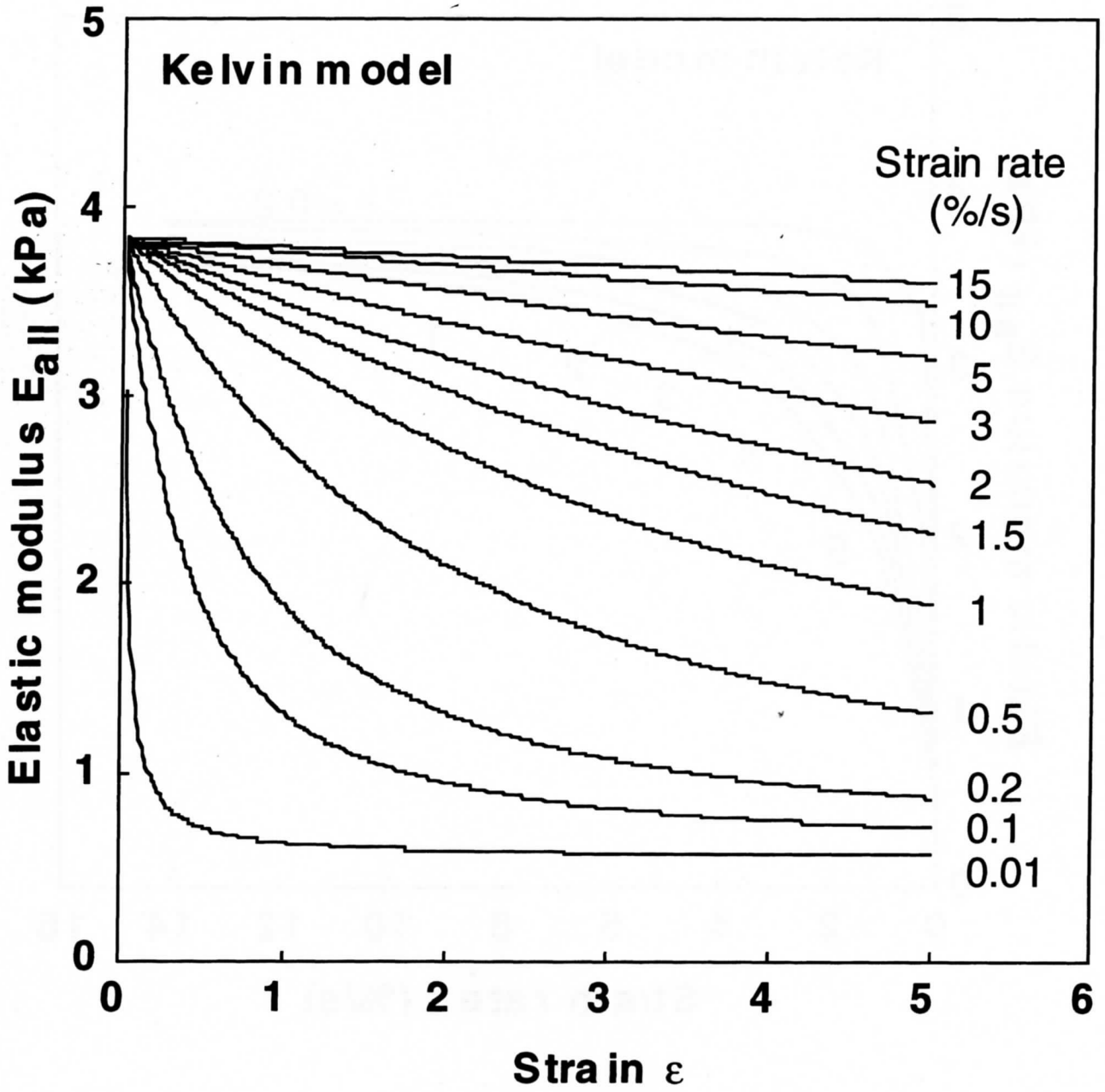


Fig.5.5.5 Kelvinモデルの代表弾性率-ひずみ関係

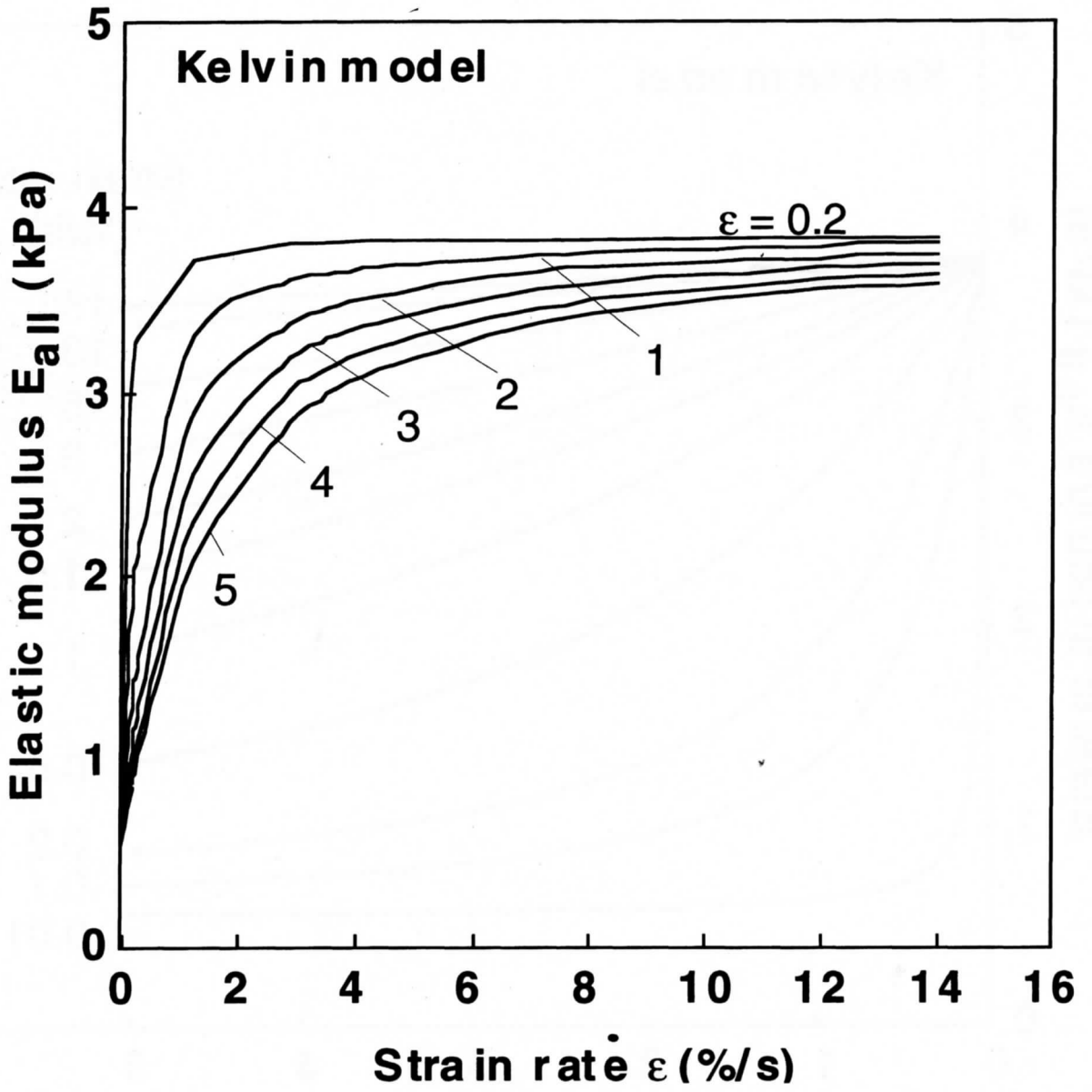


Fig.5.5.6 Kelvinモデルの代表弾性率—ひずみ速度関係

5.6 考察

5.6.1 装置の性能について

本装置で用いた水浸型60倍対物レンズと2.5倍リレーレンズにより実際にモニタに映し出される範囲は約 $140 \times 105 \mu\text{m}$ であり、CCDカメラの有効画素数は 768×494 であるので水平方向の分解能は1画素あたり $0.18 \mu\text{m}$ となる。また、本装置で使用した画像処理装置は水平方向の分解能がモニタ上で1/2560である。したがって本装置の解像度はカメラによって決定されることになり、 $0.18 \mu\text{m}$ である。力の分解能は用いるバネ定数 k によって決定され、 $(k \times 0.18) \mu\text{N}$ となる。本研究で用いたバネ定数 k は $0.002 \sim 0.684 \text{N/m}$ であったので、力の分解能は $0.0003 \sim 0.12 \mu\text{N}$ となる。 $k=0.684 \text{N/m}$ のたわみピペットはバネ定数が高く分解能が低かったため、3.2で述べたようにこれを使用して引張試験したデータは初期弾性率を計算することができなかった。また $k=0.002 \text{N/m}$ のたわみピペットを用いた培養ウシ平滑筋細胞の引張試験では、細胞に引張を負荷した際、たわみが大きいため引張が細胞に加わず、引張途中にモニタの画面から外れた。このようにバネ定数の値は小さすぎても問題が生じる。バネ定数の値は引張を負荷する細胞にも異なるが血管平滑筋細胞の場合は、実験からおおよそ $k=0.05 \text{N/m}$ 程度が適当と考えられ、このたわみピペットのカンチレバー部の寸法は外径がおおよそ $30 \sim 50 \mu\text{m}$ で長さが約 10mm である。この時の力の分解能は $0.009 \mu\text{N}$ となり細胞レベルの力(数 μN)を測定するには十分な分解能となる。また、たわみピペットのバネ定数は 0.001N/m 程度までは容易に作製でき、また5倍のリレーレンズを用いることでカメラの解像度は $0.09 \mu\text{m}$ となるので、力の分解能は 0.1nN 程度になることから、細胞を構成する組織を単離できれば、核や細胞膜、アクチンフィラメントなどの微小線維などの力学特性も計測可能と考えられる。しかしながら、このような微小な組織の引張試験を行おうとするとその把持方法が問題となる。ピペットによる吸引ではピペット内に吸い込まれる可能性があるため、化学的処理による接着などによる把持方法が期待される。

5.6.2 他の細胞引張試験機との比較

まず光学系に関しては、他の研究では細胞把持の操作性、駆動部の配置のし易さから倒立顕微鏡を用いている。本装置では正立顕微鏡を用いることにより溶液に直接レンズを浸す水浸型対物レンズを利用することができた。通常の対物レンズでは細胞と対物レンズの間に空気層やディッシュの底面が存在し、これによる像の劣化が避けられないが、本法では細胞を直接観察することできるため、より鮮明な像を得ることができる。鮮明な像を得られることは、引張途中の細胞の内部構造の変化をインプロセス計測する点で非常に優れている。しかし通常の正立顕微鏡では、観察ステージが上下し、これが細胞の操作を妨げる場合がある。このため本顕微鏡は鏡筒上下式のものをを用いることにより細胞、および細胞用ディッシュが静止した状態で存在し、またピペットを用いて細胞を操作する上で、ピペットの操作性が高く、正立顕微鏡を用いて倒立顕微鏡と同様の細胞の操作が行えるようになった。

続いて、力の計測機構について比較する。5.1.2節で述べた細胞の引張試験の報告においては、力はすべてカンチレバーのたわみから測定されている。しかしカンチレバーの微小なたわみの測定方法は報告ごとに異なっている。Palmerら(1996)は市販のフォーストランスデューサ(406A, Aurora Scientific Inc.)を用いており、これは細胞レベルの力を測定している報告でよく用いられているものである。このたわみ計測方法はAFMなどに用いられているようにカンチレバー先端にレーザをあて、たわみによる反射光の変化を光センサにより検出する方法である。またMiyazakiら(2000)は厚さ $30 \mu\text{m}$ のステンレス箔に半導体ひずみゲージを貼り、半導体ひずみゲージの抵抗変化を利用してたわみを検出していたが、温度ドリフトが大きいこと、長谷川ら(2000)は改良しレーザ変位計を用いてたわみを検出している。Thoumineら(1999)はマイクロプレート($0.075 \times 1 \times 100$)に化学的処理により接着力を持たせ、一對のマイクロプレートで挟んで把持しており、このマイクロプレートのたわみを画像から測定している。Palmerらや長谷川らの方法はカンチレバー部分が空气中にあり、そこから連結部、ピペットを介して水中の細胞を把持している。この方法は細胞とカンチレバー

5. 研究成果

5.6 考察

部が離れているため正確な力を測定しにくく、水面の動きや風などの外乱の影響を受けやすい。Thoumineらの用いたマイクロプレートや本装置に用いたたわみピペットはカンチレバー部が水中に存在するため外乱の影響を受けにくく、細胞にかかる力のみを正確に計測できる点で優れており、また細胞の伸びおよび力の計測はビデオに録画した画像から実験終了後に何回でも解析できるため、より精度の良い細胞の伸びと力を計測できると考えられる。一方、本装置の欠点は、力の分解能がたわみピペットのバネ定数に依存するため、それぞれの引張試験において力の分解能が異なり、また細胞に加わる引張速度もたわみピペットのバネ定数の影響を受けるため、それぞれの引張試験を同じ引張速度で行うことができないことが上げられる。

次に細胞の把持方法であるが、Palmerらや長谷川らの方法は本装置と同様にマイクロピペットで吸引して把持をしている。Thoumineらは上記に述べたようにマイクロプレートで挟むことで把持をしている。しかし、これらの報告はすべて球形をした細胞の引張試験である。細長い形状の単離平滑筋細胞の引張試験を報告しているWarshawら(1983)やGrerumら(1983)はマイクロピペットの先端部に細胞の端を結びつけて把持する方法を用いている。これらは胃、膀胱、子宮などから単離した平滑筋細胞であり、血管平滑筋細胞よりも更に細長い形状をしているため、このような結びつけて把持する方法を用いている。しかし血管平滑筋細胞の場合十分な長さがないため、この方法で把持するのは困難であった。そこで本研究ではマイクロピペットで吸引し、把持する方法を採用した。しかし、細長い形状による把持の困難さから単離ラット血管平滑筋細胞では十分な引張を負荷することができなかつた。ゆえに、単離血管平滑筋細胞用に何か新しい把持方法を検討する必要があると考えられる。例えば、細長いピペットの先端から数 $10\mu\text{m}$ の位置で本たわみピペットのように曲げる加工ができ、またピペットを $10\mu\text{m}$ 程度のぶれで回転できる機構を開発すれば、細胞の端を引っかけ、ピペットを回転させることで細胞を把持する方法も考えられる。また、細胞の端を挟む、つまむといったミクロンオーダーの動きが行えるマイクロマシンを開発できれば細胞の端を容易に端できると考えられる。

5.6.3 今後の課題

本装置を用いたことにより培養ウシ血管平滑筋細胞についてはその引張特性を計測でき、Kelvinモデルにより粘弾性特性も明らかになった。しかしながら、酵素分散法により単離したラット血管平滑筋細胞は、時間経過による形態変化が激しく、また細長い形状による把持方法の困難さから十分な引張を加えることができず、本研究で得られた力学特性だけではまだ不十分である。特に単離したラット血管平滑筋細胞の粘弾性特性を明らかにすることは、合成型の平滑筋細胞と比較する上でも非常に重要である。よって、時間経過による形態変化の影響を少なくし、細長い形状の血管平滑筋細胞を把持できるような新たな把持方法を考案することが要求され、これにより単離血管平滑筋細胞の力学特性が解明できると考えられる。

本装置では水浸型対物レンズを用いたことにより引張途中の細胞内部の構造も観察できた。この引張途中の細胞の内部構造の移動を定量的に観察することにより、細胞内部の力学特性を計測できると考えられる。近年、遺伝子操作の手法を用い、血管平内皮細胞のアクチンフィラメントを生きたまま蛍光染色する方法が確立されつつある(橋本, 1998)が、本法を平滑筋細胞に応用すれば、引張に伴う細胞の変形をより詳細に観察することが可能になると考えられる。また、細胞に力学的刺激を加えると、細胞内 Ca^{2+} が上昇することが知られている。細胞の引張試験過程における細胞内 Ca^{2+} を観察することは非常に興味深いと考えられる。

5.7 結 言

細胞全体の力学特性を計測できる細胞用引張試験機を開発した。この結果：

- 1) 従来ほとんど報告されていない血管平滑筋細胞の引張特性を精度良く計測でき、また引張の様子を明瞭に観察することができた。
- 2) 培養ウシ血管平滑筋細胞の力-伸び関係の傾きおよび弾性率は他の非筋細胞のそれと比較して高い値を示した。
- 3) この合成型の培養ウシ血管平滑筋細胞に比べ、収縮型の単離ラット血管平滑筋細胞は有意に高い弾性率を示した。
- 4) 3要素固体モデルを用いることで培養ウシ血管平滑筋細胞の粘弾性特性評価した結果、他の細胞と比べ粘弾性的性質が強いことが明らかになり、増分弾性率から粘性要素が完全に緩和したときの弾性率を求められることが明らかになった。

5.8 参考文献

- Sato M, Levesque MJ, Nerem RM (1987) Application of the micropipette technique to the measurement of the mechanical properties of cultured bovine aortic endothelial cells. *ASME J Biomech Engng* 109:27-34
- Theret DP, Levesque MJ, Sato M (1988) The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell Micropipette measurements. *Trans ASME J Biomech Engng* 110:190-199
- 長山和亮 (1998) AFMシステムによる血管内皮細胞の力学的特性評価 東北大学大学院工学研究科平成9年度修士論文
- Crick FHC (1950) The physical properties of cytoplasm. A study by means of magnetic particle method II. Theoretical treatment, *Exp. Cell Res* 1:505-533
- Palmer Roy E, Allan JB, Kenneth PR (1996) Mechanical measurements from isolated cardiac myocytes using a pipette attachment system. *Am J Physiol* 270 (Cell Physiol 39):C697-C704
- Thoumine O, Ott A (1997) Time scale dependent viscoelastic and contractile regimes in fibroblasts probed by microplate manipulation. *J Cell Sci* 110:2109-2116
- Omata S (1996) Development of micro tactile sensor for detecting stiffness of cell using piezoelectric element and applications. *Technical Digest 14th Sensor Symposium*:203-206
- Miyazaki H, Hasegawa Y, Hayashi K (2000) A newly designed tensile tester for cells and its application to fibroblasts. *J Biomechanics* 33:97-104
- Warshaw DM, Fay FS (1983) Cross-bridge elasticity in single smooth muscle cells. *J Gen Physiol* 82:157-199
- Glerum JJ, Van Mastrigt R, Van Koeveeringe AJ (1990) Mechanical properties of mammalian single smooth muscle cells. *J Muse Res Cell Motil* 11:453-462
- 長谷川佳孝、宮崎浩、林紘三郎 (2000) 血管平滑筋細胞の引張特性 第12回バイオエンジニアリング講演会講演論文集:57-58
- 清尾慎司 (1999) 血管平滑筋の単離及びその形状計測に関する研究 東北大学工学部平成10年度卒業論文
- Jones WR, Ping Ting-Beall H, Lee GM, Kelley SS, Hochmuth RM, Guilak F (1999) Alteration in Young's modulus and volumetric properties of chondrocytes isolated from normal and osteoarthritic human cartilage. *J Biomechanics* 32:119-127
- Campbell JH, Campbell GR, McConnell JD, Gröshel-Stewart Ute (1977) Comparison of vascular smooth muscle cells from adult human, monkey and rabbit in primary culture and in substructure. *Cell Tissue Res* 177: 503-522
- Hochmuth RM, Worthy PR, Evans EA (1979) Red cell extensional recovery and the determination of membrane viscosity. *Biophys J* 26:101-114
- Schmid-Schönbein GW, Sung KP, Tözeren H (1981) Passive mechanical properties of human leukocytes. *Biophys J* 36:243-256
- Sato M, Theret DP, Wheeler LT, Ohshima N, Nerem RM (1990) Application of the micropipette technique to the measurement of cultured porcine aortic endothelial cell viscoelastic properties. *J Biomed Eng* 112: 263-268
- 橋本謙 (1998) 流れのせん弾応力負荷時における培養血管内皮細胞の細胞骨格の時間変化 東北大学大学院工学研究科平成9年度修士論文