

# 人工培養粘膜設計のための基礎研究 —人工培養粘膜収縮のシミュレーション—

高橋 国人\*・三宅 仁\*\*・上田 実\*\*\*・福本 一朗\*

## Basic Study for Designing of Bioartificial Mucosa —Computer Simulation for the Mucosal Contraction—

Kunihito TAKAHASHI, Hitoshi MIYAKE, Minoru UEDA, Ichiro FUKUMOTO

Bioartificial mucosa which consists of fibroblast and collagen, is a convenient model for study of relationship between cell and intercellular substance. To design the bioartificial mucosa is not easy, as the mucosae contract itself to the smaller size than is anticipated. This study aims to propose a mathematical model of the mucosal contraction from the view point of biorheology. Computer simulations are executed to simulate the contraction. The simulated results show good coincidences with the experimental results of fibroblast cell cultures.

**Key words:** bioartificial mucosa/contraction/mathematical model/biorheology

### 1. はじめに

組織の基本単位の一つに細胞間物質がある。細胞間物質は細胞と細胞を接着しているだけでなく、細胞と共に生命現象を支えていることが判明してきた。コラーゲンゲルに繊維芽細胞を内包して構成される粘膜固有層組織モデル（以下人工培養粘膜）では、作成時にそれ自身が等方的に収縮するという現象が観察される。この現象は細胞がコラーゲン分子を牽引しコラーゲン分子密度を増加させ、規則的に配列させた結果生じたものであり、このことで適当な機械的強度と細胞の足場としての環境がもたらされたと考えられる。この収縮はババベリンなどの筋弛緩剤で抑制される点<sup>1)</sup>、および細胞外マトリックスを再構築する点<sup>2)</sup>で創傷治癒過程の拘縮と類似しており、細胞間物質が細胞との深い関わりをもちながら生体の再生・復元・修復に関与していることを示唆している。

人工培養粘膜の臨床応用例としては、患者自身の細胞を利用して作成された人工培養粘膜の上に上皮細胞

を培養して作成する人工培養皮膚の移植などがある。それは、熱傷や皮膚欠損の傷害に対して、提供者側の不足や拒絶反応などに対する考慮が最小限ですむ有効な治療手段になりうる。さらに、自然治癒に比べて創傷治癒を加速度的に進行させると考えられる。しかしながら、この移植は普遍的には行なわれていない。その大きな理由の一つは前述のように人工培養粘膜が収縮するため、患部と合致しない場合があることであり、現状では最終的な収縮程度を経験に頼らざるを得ないからである。

我々は細胞と細胞間物質の関係を研究するための最も単純化された実験系の一つとして人工培養粘膜を考えた。本研究では共同研究者である上田が得た実験結果を用いてレオロジーの観点から人工粘膜収縮の数理モデルを構築し、計算機上でシミュレートすることによって収縮機序の解明を試みた。収縮機序の解明は前述の問題解決のための直接的推進力になり得るとともに、二次的に創傷治癒過程の拘縮機序解明の手助けとなる可能性を秘めている。

### 2. 数理モデル

コラーゲンに繊維芽細胞を混合し、しばらくすると細胞は細胞突起を伸長し始める。収縮はこの時期に一

原稿受付：平成6年6月16日

\*長岡技術科学大学生物系

\*\*長岡技術科学大学体育保健センター

\*\*\*名古屋大学医学部口腔外科

致して起り<sup>3)</sup>, 培養皿の形状を維持したまま進行する。Fig. 1 に直径の変化, 細胞突起を伸長している細胞数の変化の模式図を示す。

伸長細胞数増加率は次のように記述される。

$$\frac{dn}{dt} = k_{nir}(k_n N - n) \quad \text{式 1}$$

n : 細胞突起伸長細胞数 [cm<sup>-3</sup>]  
 k<sub>nir</sub> : 細胞突起伸長細胞増加係数 [sec<sup>-1</sup>]  
 N : 全細胞数 [cm<sup>-3</sup>]  
 k<sub>n</sub> : 比例定数 [-]

細胞突起の長さは指数関数的に増加をすると推察される。但し, 突起が永遠に伸長し続けるとは考えられないので限界値を設定した。細胞突起長の伸張率は次のように記述される。

$$\frac{dl}{dt} = k_{igr} \ln \frac{l_{max}}{l} \quad \text{式 2}$$

l : 細胞突起長 [cm]  
 k<sub>igr</sub> : 細胞突起伸長係数 [sec<sup>-1</sup>]  
 l<sub>max</sub> : 最大突起長さ [cm]

収縮を引き起す応力は細胞突起伸長細胞数の増加や細胞突起長の増加に伴うと仮定し, 突起長の細胞数だけの総和に比例するとした。式 1 より求められる細胞突起伸張細胞数(n)と式 2 より求められる細胞突起長(l)を用いて応力を次式のように表わした。

$$\sigma = k_r \sum_{i=1}^n l_i \quad \text{式 3}$$

σ : 応力 [dyn cm<sup>-2</sup>]  
 k<sub>r</sub> : 比例定数 [g sec<sup>-2</sup> cm<sup>-2</sup>]  
 l<sub>i</sub> : 各細胞の突起長 [cm]

人工培養粘膜収縮のひずみは 4 要素モデルの一般式によって式 4 となり, ひずみより実際の直径が算出される。

$$\frac{d\varepsilon}{dt} = \frac{1}{E_1} \frac{d\sigma}{dt} + \frac{1}{\eta_2} (\sigma - E_2 \varepsilon_2) + \frac{\sigma}{\eta_1} \quad \text{式 4}$$

$$R = R_f(1 - \varepsilon) \quad \text{式 5}$$

ε : ひずみ [-]  
 E : 弾性率 [dyn cm<sup>-2</sup>]  
 η : 粘性係数 [poise]  
 ε<sub>2</sub> : 並列要素のひずみ [-]  
 R : 人工培養粘膜の直径 [cm]

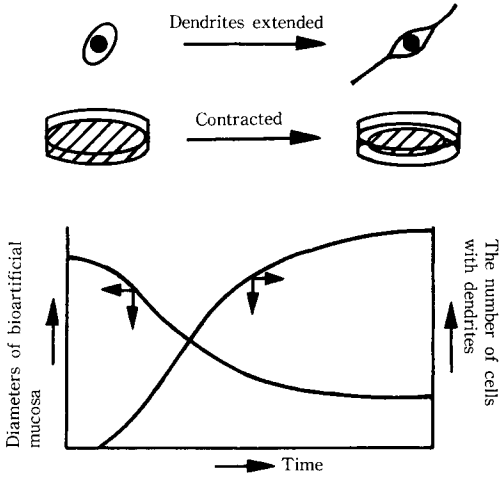


Fig. 1 Relationships between the number of cells with dendrites and the contraction of the bioartificial mucosa. Consults report of reference 3).

これらのことから「粘膜固有層組織モデル収縮は繊維芽細胞の経時的形態変化に起因する」と仮定した。さらに, 収縮は等方的であるので一次元で近似できると推定される。

高分子溶液やゲルの物理特性は粘弾性系として表現できる。本報告では構造を簡単にするためにフォークトモデルとマクスウェルモデルを直列につなげた 4 要素モデルを用いて近似を試みた (Fig. 2)。

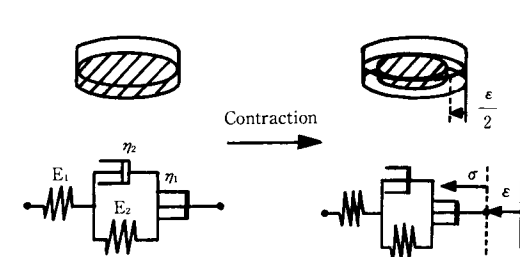


Fig. 2 A model for the contraction of bioartificial mucosa.

細胞突起を伸長している細胞数は全細胞数とすでに賦活済みの細胞数の差, つまり, まだ突起を伸長していない細胞が一定の割合で賦活するとした。細胞突起

$R_f$  : 最初の直径 [cm]

### 3. 計算機シミュレーション

式 1, 式 2 の各パラメータ値はシミュレーション値を実験値に近似させることにより決定した。Fig. 3 に細胞突起伸長細胞数, Fig. 4 に細胞突起長の演算結果

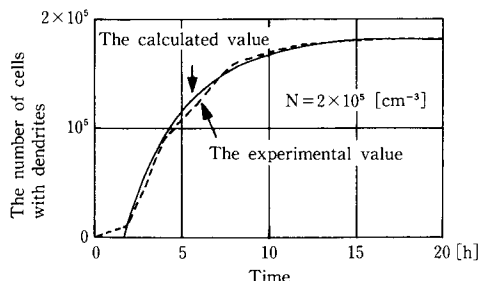


Fig. 3 A result of calculation for the number of cells with dendrites.  $kn_{ir}=7.64 \times 10^{-5} [\text{sec}^{-1}]$ ,  $kn=0.925 [-]$ . The experimental values are obtained from the reference 1).

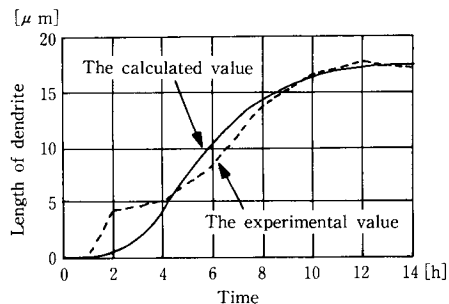


Fig. 4 A result of the calculation for length of dendrites.  $klgr=1.32 \times 10^{-4} [\text{sec}^{-1}]$ ,  $lmax=1.78 \times 10^{-3} [\text{cm}]$ . The experimental values are obtained from the reference 1).

をそれぞれ示す。

実際の細胞突起伸長細胞数の演算は原点から行われるが, Fig. 3 では約 2 時間正方向へスライドしている。本来, 計算機上では賦活し始めた細胞, つまり, 細胞突起が顕微鏡で確認できない細胞をカウントするが, 観察上は突起が確認できる長さまで待たなければならない。その時間遅れを考慮し, 原点をスライドして式 2 のパラメータ値を決定した。

式 3 の比例定数( $k_f$ )は全くの未知であるため, 仮に  $1 [\text{g sec}^{-2} \text{cm}^{-2}]$  と設定した。今回のモデルで最も近似した状態を知りたいため, 式 1 のパラメータ値決定

の時と同様の細胞数 ( $2 \times 10^5 [\text{cm}^{-3}]$ ) で実験された際の結果を参照して, 収縮のシミュレーションを行った。式 4 におけるシミュレーション上の粘性係数 ( $\eta_1, \eta_2$ ) や弾性率 ( $E_1, E_2$ ) は収縮の値が実験値に近くなるよ

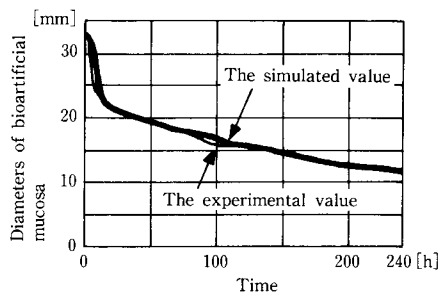


Fig. 5 Comparison of the simulated value and the experimental value. The experimental values are obtained from the reference 1).

う変化させた。良く近似した例を Fig. 5 に示す。

次に, モデルの汎用性を検討するために, 一つの試みとして Fig. 5 で用いられたパラメータ値を保持したまま, 細胞数が違う 4 つの場合 ( $0, 1 \times 10^4, 5 \times 10^4, 1 \times 10^5 [\text{cm}^{-3}]$ ) でシミュレーションを行った。結果を Fig. 6 に示す。また, 用いた各パラメータ値の細胞数以外を Table 1 に示す。

シミュレーション値と実験値を比較すると特に C, D で差が大きく (Fig. 7), 10 日後の最終的な値の誤差はそれぞれ  $-53\%$ ,  $-57\%$  であった。

### 4. 考 察

本報告が意図するところは人工培養粘膜収縮機序の解明を目指した粘弾性系モデルを含むシミュレーションの試みである。シミュレーションが収縮の経時的変化をうまく模倣していること (Fig. 5) は機序解明における粘弾性系モデルの可能性を示している。しかしながら, 最初の試みとしてできるだけ簡単な数理モデルを構築したためか, 多くの課題を残した。

式 1 において比例定数 ( $k_n$ ) が 1 以下になったことは収縮に寄与した細胞数が継代した細胞数より少なかったことを示しており, 継代などの諸実験処理によるストレスで細胞が死滅したことが推察される。

式 4 におけるシミュレーション上の粘性係数 ( $\eta_1, \eta_2$ ) と弾性率 ( $E_1, E_2$ ) の大きな比 ( $\eta_1/E_1=2.84 \times 10^8$ ,  $\eta_2/E_2=6.68 \times 10^5 [\text{sec}]$ ) は通常のゲルヤゾルであまり類を見ない。比例定数 ( $k_f$ ) を代えても比はほとんど変

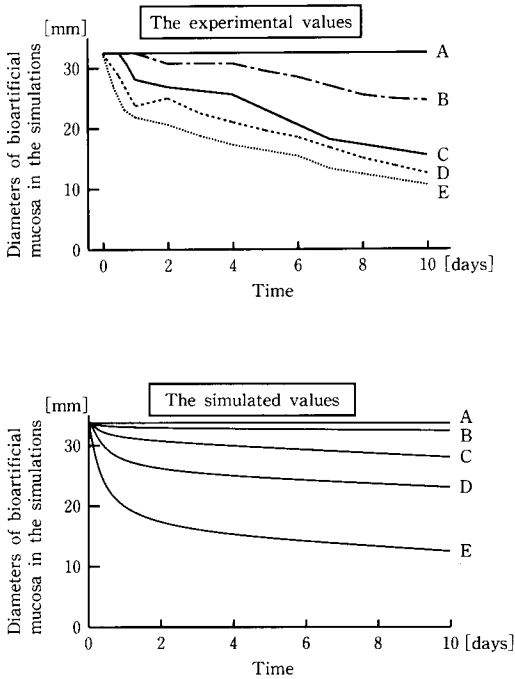


Fig. 6 Comparison of the simulated value and the experimental value with various cell density. A: 0[cm<sup>-3</sup>], B: 1 × 10<sup>4</sup>[cm<sup>-3</sup>], C: 5 × 10<sup>4</sup>[cm<sup>-3</sup>], D: 1 × 10<sup>5</sup>[cm<sup>-3</sup>], E: 2 × 10<sup>5</sup>[cm<sup>-3</sup>]. The experimental values are obtained from the reference 1).

Table 1. Parameters for the simulation

k <sub>nfr</sub>	7.64 × 10 <sup>-6</sup> [sec <sup>-1</sup> ]	E <sub>1</sub>	250 [dyn cm <sup>-2</sup> ]
k <sub>n</sub>	0.925 [-]	E <sub>2</sub>	750 [dyn cm <sup>-2</sup> ]
k <sub>igr</sub>	1.32 × 10 <sup>-4</sup> [sec <sup>-1</sup> ]	η <sub>1</sub>	7.21 × 10 <sup>10</sup> [poise]
l <sub>max</sub>	1.78 × 10 <sup>-3</sup> [cm]	η <sub>2</sub>	5.01 × 10 <sup>8</sup> [poise]
k <sub>f</sub>	1 [g sec <sup>-2</sup> cm <sup>-2</sup> ]	R <sub>f</sub>	3.2 [cm]

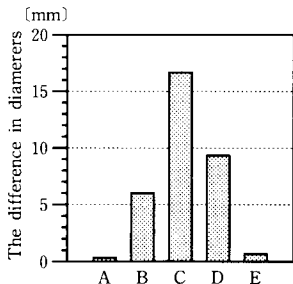


Fig. 7 Differences between the simulated values and the experimental values of the tenth day. A: 0[cm<sup>-3</sup>], B: 1 × 10<sup>4</sup>[cm<sup>-3</sup>], C: 5 × 10<sup>4</sup>[cm<sup>-3</sup>], D: 1 × 10<sup>5</sup>[cm<sup>-3</sup>], E: 2 × 10<sup>5</sup>[cm<sup>-3</sup>].

わらなかった。数理モデルに何らかの機構が欠如していると考えられる。

コラーゲンゲル中で繊維芽細胞を立体培養することにより作成される人工培養粘膜はたいていの場合、培地中に血清を含む。収縮は血清非存在下ではほとんど進行しない<sup>1)5)</sup>。このことは血清濃度が収縮機序に関係していることを示している。本研究の数理モデルでは細胞突起を伸長している細胞数や細胞突起の長さが増すと収縮が増す。Fig. 6, 7で細胞数が少ない場合に誤差が大きくなった原因の一つとして、単位領域当たりの細胞数が少ない場合、細胞1個当たりの血清量が多く、細胞の賦活程度や突起の長さがシミュレーションを凌駕したことが考えられる。その結果、実際の収縮測定値がシミュレーション値よりも大きくなったと推察される。また、細胞同士の接触因子が存在すれば実際の測定結果で細胞数が多い場合(Fig. 6 C, D, E)の収縮に大差なかったことを、接触因子の影響によって細胞突起の伸長が抑制されたとして説明できるかもしれない。

今回、細胞突起の長さとして人工培養粘膜の収縮を相関づけたシミュレーションを試みた理由は突起が長くなればそれだけコラーゲンを牽引できる機会が増すと考えられたからである。数理モデルでは細胞突起の収縮を考慮に入れていない。これも誤差の原因の一端であるだろう。

収縮は繊維芽細胞の細胞密度やコラーゲン濃度にも影響される<sup>6)</sup>、繊維芽細胞の分裂能がコラーゲンゲル中で抑制されることなどから<sup>7)8)</sup>、血清濃度のみならず細胞密度やコラーゲン濃度も互いに関係しあいながら収縮に影響していると予想される。今後、有効な数理モデルの完成には細胞密度、血清濃度、コラーゲン濃度などのより詳細な因子の考慮が必要である。

## 5. まとめ

粘膜固有層組織モデルの作成段階でそれ自身が収縮する現象が観察される。本報告中では収縮機序を解明するためにレオロジーの観点から数理モデルを構築し、収縮のシミュレーションを試みた。その結果、収縮の経時的変化傾向を良く模倣した。しかしながら違う細胞数などでの汎用性を持たせるためには血清濃度など、より詳細な因子による影響の考慮が必要であると考察される。

参考文献

- 1) Sasaki, S., Ueda, M., Ebata, K., Kaneda, T., Saga, S., Matsuyama, M.: J. Jpn. Stomatol. Soc. 39 (1): 140-150, 1990
- 2) 浅加宏昭, 吉里勝利: 有機高分子ゲル(日本化学会編季刊化学総説 No. 8), 学会出版センター: p. 159, 1990
- 3) 上田 実: 細胞, 22(5): 26(182)-30(186), 1990
- 4) Takahashi, K., Miyake, H., Ueda, M., Fukumoto, I.: JJME 32 Suppl.: 170, 1994
- 5) 吉里勝利, 平敏夫: 北里大学医学部総合研究報告集: 1983-6
- 6) Bell, E., Ivarsson, B. and Merrill, C.: Proc. Natl. Sci. 76: 1274-1278, 1979
- 7) Sarber, R., Hull, B., Merrill, C., Sorenno, T. & Bell, E.: Mech. Age. Dev., 17: 107-117, 1981
- 8) Yoshizato, K., Taira, T. & Yamamoto, N.: BioMed. Res., 6: 61-71, 1985