

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500522

研究課題名(和文) マイクロダメージを誘因とする生体組織の恒常性制御と力学的適応反応の機序解明

研究課題名(英文) Relationships between the homeostatic responses and microdamages in biological tissues

研究代表者

山本 衛 (YAMAMOTO, Ei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号：00309270

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体組織の微視的損傷は、機能維持と障害発生という互いに反する面に関与する極めて重要な事象である。生体硬組織である骨のみならず、軟組織である皮膚や血管においても、組織に発生する部分的ダメージに関する研究は十分に行われていないのが現状である。本研究での一連の実験によって、生体軟組織である血管や皮膚、あるいは生体硬組織である骨などの力学的特性が変化していく状況下では、組織内に微視的な損傷が発生していることが推察され、骨粗鬆症や紫外線による皮膚ダメージさらには高血圧による血管の損傷などの病的状態の発生や、各組織の力学的機能の維持がどのような機構で行われているのかについての知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Microdamage in load-bearing biological tissues is an important factor related to their homeostatic responses and diseases. However, there have been only a few reports on the microdamages not only in hard tissues such as bones but also in soft tissues such as blood vessels, tendons, and skins. In the present study, changes in the mechanical properties of osteoporotic bones, ultraviolet-irradiated skins, and hypertensive arteries were elucidated by means of compressive, tensile, or internal pressure tests. It was speculated that the decreases in the mechanical strength were linked to the microdamages in the tissues. We have an insight into the mechanisms of homeostatic responses and healing process in biological tissues.

研究分野：バイオメカニクス

キーワード：バイオメカニクス 微小損傷 損傷治癒 力学的特性 生体硬組織 生体軟組織

1. 研究開始当初の背景

力学的環境の変化に対する、生体機能の維持や適応反応のメカニズムは、十分に解明されていないのが現状であり、マクロな組織に生じる現象とミクロな構造変化に関する詳細な研究が必要とされている。生体組織には日常的に何らかの力学的負荷が作用しており、これに適合するような構造や特性を組織は有しており、作用する負荷によってその性状が顕著に支配されていることが知られている。生体内では、常に形成と吸収を繰り返されており、新しい組織に生まれ変わりながら、必要な機能を維持している。その過程では、組織に発生する軽度な損傷が、新陳代謝プロセスを制御しており、微小損傷の修復が機能の健全性を維持するために必要であるものと考えられている。このように、持続的負荷によって生じる生体組織の部分的損傷は、生体の機能維持にとって不可欠であるが、過度の損傷は組織破断を引き起こす。つまり、微小損傷は、機能の維持と障害の病因という2つの面に関連する極めて重要な事象である。

上述したように、生体組織に生じる軽度の損傷は、組織の健全性と密接に関連している重要な問題であるが、微小損傷に関する研究が十分に実施されていないことに起因して、その発生程度は定量的に把握されていない。特に、生体軟組織である腱や靭帯、皮膚、血管などに発生する微小損傷に関する研究は、全く行われていない。これらの軟組織でも力学的負荷下で組織の吸収と形成が常時繰り返されており、損傷の修復機構が組織の新陳代謝プロセスと関連している可能性は十分に考えられる。しかし、この仮説の検証は試みられておらず、軟組織の恒常性や適応機構において微小損傷の果たす役割は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、生体恒常性や組織再構築を制御する主要因は、組織に発生する微小損傷であると考え、組織の老化、機能不全、疾患などの現象も軽度な損傷とどのように関連しているのか明らかにする。従って、本研究から得られる成果は、組織の形成、吸収、再生を人為的に制御する技術への展開も可能であるものと考えられ、臨床医学分野における生体組織の疾患に対する治療や、組織工学的手法による損傷組織の再生医療技術の開発など、医学応用面にも非常に有用な情報を提供するものと期待される。

3. 研究の方法

(1) 脳卒中易発症ラットより摘出した皮質骨試料の生体力学的特性

本実験では、脳卒中易発症モデル動物の Store prone spontaneously hypertensive ラット(オス、12週齢)を使用した。このラットは、各世代において脳卒中で死亡した親

からの子を選抜しており、遺伝的に脳卒中を発症する系統となっている。その病理学的な特徴は、ヒトの場合と極めて類似していることが確認されている。また、雄の個体では雌の1.4倍程度、脳卒中が早期に発症することが知られている。

これらのラットから大腿骨を摘出した(SHR SP群)。一方、比較対照用の正常ラット大腿骨を Control 群の試料とした。各個体の大腿骨の全長Lをノギスで計測し、膝関節側からL/3の位置にマーカを印し、このマーカの位置を確認しながら、幅10mmに切断したアルミパイプにポリメチルメタクリレートで骨試料を垂直に埋入固定した。次に、マイクロカッタに取り付けたダイヤモンド回転鋸刃を使用して、L/3の位置及びそこから大腿頭骨側に3mmの位置で切断した。これにより、大腿骨骨幹部から長さ3mmのリング状試験片を作製した。

リング状試験片の長さの計測には、マイクロメータを使用した。また、骨試料の断面積はCCDカメラと画像処理装置を用いて光学的に測定した。その後、万能材料試験機(AGS-H、島津製作所)を使用して、試料を37℃生理食塩水中に浸漬させた状態で準静的圧縮破壊試験を行った。荷重の測定には、最大荷重容量5kNのロードセルを用いた。一方、試験機のコンプライアンス等の影響を取り除き、微小変位を精度よく測定するために、圧縮板の移動量をレーザ変位計を用いて計測することで試料の変形を求めた。

(2) 創傷治癒過程におけるヘアレスラット皮膚の生体力学的評価

実験は8週齢のヘアレスラット(雄)を用いて行った。5匹のラットには背部皮膚に0.5×10mmの矩形欠損を1カ所作成した。その際、欠損の深さは皮下組織に到達するようにした。背部皮膚の欠損部位を Wound 群とし、欠損のない部位の皮膚を Control 群とした。また、6匹のラットの背部皮膚にハンディ型UVランプ(UVM-57, Funakoshi)を用いて紫外線を12週齢時まで、週に3回照射した。紫外線による損傷を確認した後、3週間飼育した。その後再び紫外線を同条件で2週間照射し、20週齢時に皮膚試料を摘出した。残りの2匹ラットには、何の処置も施さず20週齢になるまで飼育した。紫外線を照射した皮膚をUV群、無処置の皮膚をUVControl群とした。これらのラットの背部皮膚よりJISダンベル状7号形の試料を作製し、力学的評価を実施した。

自作の生体軟組織用断面積測定装置を使用して、試験片の断面積を測定した。この装置には、レーザ変位計が組み込まれており、非接触で生体軟組織の断面積を測定することが可能である。レーザを試料の表面へ照射することで試料の厚みを求め、この測定を0.1mm間隔で試料の幅全体に対して実施した。この後、得られた測定値をもとに試料の断面

形状を多角形近似することで、断面積を算出した。断面積は、試料の中央及びその上下 2 mm の位置の合計 3 カ所で測定し、それらの平均値を試験片の断面積とした。

ひずみ計測用のマーカとして、長軸方向に離れた 2 本の線を試料表面にニグロシンで印した。引張試験には、万能材料試験機 (EZ Test/CE, 島津製作所) を使用した。ひずみの計測には、試料実質部以外で生じる変形の影響を除去するために Video dimension analyzer (C3160, 浜松ホトニクス) を使用した非接触計測を行なった。まず、プリロードとして 0.01 N を作用させ、ゼロ点設定した後、引張速度 20 mm/min で試料が破断するまで負荷試験を行なった。なお、皮膚組織は通常外気に曝されていることを考慮して、室温空气中で力学試験を実施した。さらに、各実験群の力学試験用試料と隣接する部位から組織観察用の試料を摘出した。摘出した試料を 10%ホルマリン溶液で組織固定した後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。得られた組織薄片から表皮および真皮の厚さを計測した。

(3) 高血圧自然発症ラットより摘出した胸部大動脈の内圧負荷試験

Wister-Kyoto ラット (WKY 群) と高血圧自然発症ラット (SHR 群) を実験に用いた。両群ともにオスの個体を使用した。19 週齢時において、各個体の血圧と体重を計測した。ラットを 10 分間予備加温 (37~40 °C) した後、ホルダーに入れて固定した。脈拍値が安定した状態で、心収縮期尾動脈圧を無麻酔下で Tail-cuff 法によって測定した。また、体重の測定は電子天秤を用いて行った。各ラットから、長さが約 8 mm の大動脈試料を両端にアルミパイプを取り付けた状態で摘出した。

アクリル製二重槽の外槽に温水を循環させることによって、37 °C に保持した内槽内の PBS 溶液中に試料を浸漬させた状態で内圧負荷試験を行った。血管試料は、生体内長さに伸長して内槽内の固定具に取り付けた。加圧にはシリンジポンプ (TE-332S, テルモ) を用いて、PBS 溶液を血管試料内へ圧送することにより、一定速度で試料に内圧を負荷した。内圧は、試料の一端に接続された圧力トランスデューサー (NODELDP-1, 測研) で計測した。また、加圧による血管外径の変化は、試験水槽の上方に設置した CCD カメラ (CCD-S2, 島津) で撮影した試料画像を Video dimension analyzer (C3160, 浜松ホトニクス) に取り込み、画像処理を実施することで測定した。内圧負荷試験の終了後、大動脈試料の外径測定部からリング状薄片 (0.5 mm) を切り出した。次に、顕微鏡下で無負荷時の内径、外径を測定した。

内圧負荷試験で 50 mmHg から 250 mmHg まで加圧した際に得られる内圧 - 外径関係のデータを解析に用いた。血管壁の力学的挙動として、生理的内圧範囲内の任意の基準内圧

に対する圧力比の対数が、基準外径に対する膨張比に比例すること知られている。この比例関係は以下の式で表される。

$$\ln\left(\frac{P_i}{P_s}\right) = \beta\left(\frac{D_0 - D_s}{D_s}\right)$$

ここで P_i は血管内圧、 P_s は基準内圧であり、 D_0 と D_s は、それぞれ内圧 P_i と P_s における血管外径である。β は比例関係の傾きであり、スティスネスパラメータ (Stiffness parameter) と呼ばれている。本研究では、血管形状にも依存する剛性の指標として、このパラメータを算出した。一方、血管壁の材質そのものの弾性を表す指標として、以下に示す増分弾性係数 H を求めた。

$$H = \left(\frac{\Delta P}{\Delta R_0}\right)\left(\frac{2R_i^2 R_0}{R_0^2 - R_i^2}\right) + \left(\frac{2PR_0^2}{R_0^2 - R_i^2}\right)$$

R_0 と R_i は、それぞれ血管の外半径と内半径である。また、 P と R_0 は、内圧 P におけるそれぞれ内圧と外半径の増分である。このパラメータは、試料の形状に依存しない材料定数であり、非線形性を示す応力 - ひずみ曲線の傾きである接線係数 (Tangent modulus) に相等する。本研究で、スティスネスパラメータと増分弾性係数を算出する際の内圧は、各群の生体内での血圧範囲を考慮し、WKY 群と SHR 群でそれぞれ 100~150 mmHg と 150~200 mmHg を選定した。また、WKY 群と SHR 群の内皮細胞層を走査型電子顕微鏡によって観察した。

4. 研究成果

(1) 脳卒中易発症ラットより摘出した皮質骨試料の生体力学的特性

ラットの大腿骨長さは、SHR-SP 群で 32.6 ± 1.7 mm (平均 ± 標準偏差)、Control 群で 35.7 ± 0.5 mm であり、SHR-SP 群では大腿骨長さに減少の傾向がみられた。さらに、SHR-SP 群 (1.59 ± 0.21 g/cm³) の骨密度は、Control 群 (1.89 ± 0.04 g/cm³) よりも低値であった。SHR-SP 群と Control 群の応力 - ひずみ線図を図 1 に示す。この応力 - ひずみ線図の傾きをひずみ 0~0.6% の間で算出した接線係数は、SHR-SP 群と Control 群で、それぞれ 26.8 ± 3.4 GPa と 101.8 ± 52.2 GPa であり、SHR-SP 群の値は、Control 群の約 1/4 倍であった。大腿骨の圧縮強度は、SHR-SP 群で 98.0 ± 11.9 MPa、Control 群で 122.5 ± 12.9 MPa であった。両群の値を比較すると、SHR-SP 群の圧縮強度が約 20% 減少していた。このように高血圧による骨組織の退行性変化を定量化するとともに、高血圧症モデルラットの骨組織が骨粗鬆症の病態を生体力学的に解明するために利用可能であることを明らかにした。

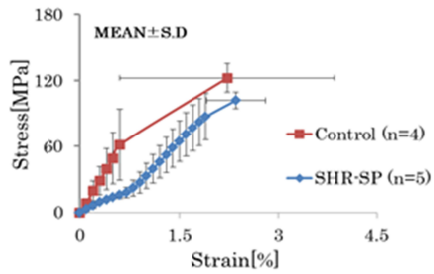


図1 骨試料の応力 - ひずみ線図
(Control 群, SHR-SP 群)

(2) 創傷治癒過程におけるヘアレスラット皮膚の生体力学的評価

引張試験の結果として、創傷を与えた皮膚である Wound 群と比較対照の正常皮膚である Control 群の応力 - ひずみ線図と、紫外線を照射した UV 群とその比較対照である UVControl 群の応力 - ひずみ線図を、それぞれ図2と図3に示す。

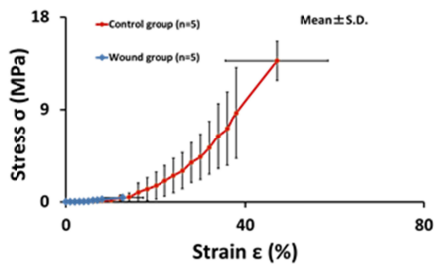


図2 皮膚試料の応力 - ひずみ線図
(Control 群, Wound 群)

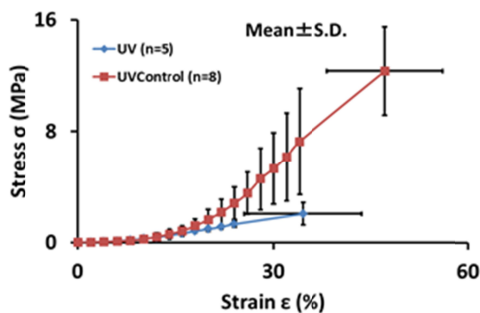


図3 皮膚試料の応力 - ひずみ線図
(UV 群, UVControl 群)

Control 群, UVControl 群の応力 - ひずみ線図は、低応力領域では応力に対するひずみの増加が大きくなっており、応力が高くなるにつれてひずみの増加率が減少しているのがわかる。各群の引張強度においては、Control 群, UVControl 群が高値を示しているのに対して、紫外線を照射して損傷させた UV 群, 皮膚に直接創傷を与えた Wound 群の順に低値を示した。また、Wound 群と Control 群との間には有意な差が認められた。さらに UV 群と UVControl 群との間にも有意な差が認められた。さらに、組織観察において、表皮、

真皮ともに紫外線を照射することで、厚さが増加することが確認された。

(3) 高血圧自然発症ラットより摘出した胸部大動脈の内圧負荷試験

19 週齢のラットの体重は、WKY 群と SHR 群でそれぞれ 400 ± 8 g (Mean \pm S.D.) と 356 ± 15 g であった。WKY 群では、 151 ± 9 mmHg の収縮時血圧が計測された。これに対して、SHR 群の心収縮時血圧は 199 ± 13 mmHg であり、高血圧状態にあることが確認された。先行研究では、16 週齢の高血圧自然発症ラットとその比較対照用の Wister-Kyoto ラットの心収縮時血圧が、それぞれ 192 ± 13 mmHg (Mean \pm S.E.) と 131 ± 3 mmHg であると報告されている³⁾。これらの血圧値を比較した場合、本実験の WKY 群ではやや高い値が計測されているが、SHR 群ではほぼ同値であった。

胸部大動脈試料に内圧を作用し、50 ~ 250 mmHg の血圧範囲で WKY 群と SHR 群の内圧 - 外径曲線を求めた。両群ともに、生理的内圧範囲では伸展性が高く、高圧力下では剛性が高くなる非線形性を示すことが、内圧 - 外径曲線の形状から認められた。しかしながら、WKY 群と比べて、SHR 群では直線に近い内圧 - 外径曲線になる傾向がみられるとともに、曲線の傾きが切りかわる変曲点は WKY 群よりも SHR 群で高圧力側でみられていた。このことから、SHR 群の血管壁の力学的特性が高血圧に対して適応していることが推察された。また、WKY 群と SHR 群の曲線を比較した場合、SHR 群では変形能に乏しく 250 mmHg での血管外径には顕著な相違がみられた。従って、SHR 群の血管では動脈硬化の状態にあることが示唆された。WKY 群では 100 ~ 150 mmHg, SHR 群では 150 ~ 200 mmHg の血圧範囲で算出したスティフネスパラメータと増分弾性係数を図4と図5に示す。SHR 群のスティフネスパラメータ (3.7 ± 0.9) は、WKY 群 (2.8 ± 0.5) よりも有意に高値であった。この傾向は、増分弾性係数の場合でも同様であり、WKY 群 (0.28 ± 0.05 MPa) と SHR 群 (0.77 ± 0.15 MPa) の間に有意な相違が認められた。先行研究 (Marque, V., et al., Hypertension, 34, 415-422, 1999) において、脈波伝搬速度と血管形状から計算される血管壁の弾性係数について報告している。これによると、15 週齢の高血圧自然発症ラットと Wister-Kyoto ラットの胸部大動脈の弾性係数は、それぞれ 1.6 ± 0.2 MPa (Mean \pm S.E.) と 0.7 ± 0.1 MPa であった。本実験では、生体内の状態に近い内圧負荷試験によって血管壁の弾性特性を求めており、過去の計測値との間には差異がみられる。しかし、両研究ともに、高血圧自然発症ラットの血管の弾性係数は、通常血圧の場合よりも高く、約 2~3 倍に増加する傾向がみられた。このことから、内圧負荷試験から求められる弾性特性によって、高血圧自然発症ラットの血管性状を評価することの妥当性が示された。また、走査型電子顕微鏡

による観察において、血管の内皮細胞層の部分的損傷が高血圧症によって引き起こされることが確認された。このように重度の高血圧症状にある疾患モデルラットの胸部大動脈の内圧-外径曲線を求め、高血圧によって血管壁の伸展性が低下することが確認されており、内皮細胞層の部分的損傷と血管壁の剛性増加との関連を示唆するデータが得られている。

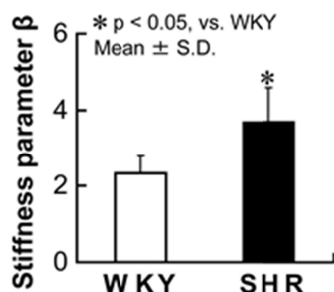


図4 血管壁のスティフネスパラメータ (WKY群とSHR群)

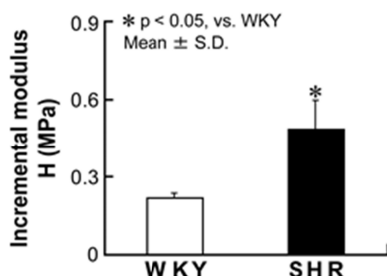


図5 血管壁の増分弾性係数 (WKY群とSHR群)

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1件)

Takemori, K., Yamamoto, E., Ito, H., Kometani, T., Prophylactic effects of elastin peptide derived from the bulbous arteriosus of fish on vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats, *Life Sciences*, Vol. 120, pp. 48-53, 2015. 査読有. DOI: 10.1016/j.lfs.2014.10.011.

〔学会発表〕(計3件)

山本衛, 竹田一平, 須崎有亮, 西真吾, 宮崎祐次, 竹森久美子, 伊藤浩行, 紫外線照射による皮膚組織の力学的特性の変化, 日本実験力学会 2014年度年次講演会, 2014年8月30日, 兵庫県立大学(兵庫県姫路市).

Yamamoto, E., Takeda, I., Miyazaki, Y., Takemori, K., Ito, H., Biomechanical properties of cortical bone obtained from experimental animal models of lifestyle-related diseases, *The 2013*

Annual Meeting of the Korean Society of Mechanical Engineering, Korea-Japan Session, 2013年5月24日, ヤオスー(韓国).

Yamamoto, E., Handa, Y., Miyazaki, Y., Takemori, K., Ito, H., Stress-strain relationship of cortical bone obtained from stroke-prone SHR, *Proceedings of the 15th International SHR Symposium/the 48th Scientific Meeting of the Japanese Society for Hypertension-Related Disease Model Research*, 2012年9月28日,メルボルン(オーストラリア).

〔図書〕(計1件)

山本衛 他, 先端医療を支える工学 - 生体医工学への誘い -, 生体医工学会編, コロナ社, pp. 12-28, 2014. (2014年3月)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://waka.kindai.ac.jp/tea/ei/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山本 衛 (YAMAMOTO Ei)

近畿大学・生物理工学部・准教授

研究者番号: 00309270

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし