



## 第36回日本バイオロロジー学会年会

### プログラム・抄録集

会 期：平成25年6月6日(木)・7日(金)・8日(土)

年会長：工藤 奨(九州大学大学院工学研究院)

会 場：九州大学 西新プラザ



日本バイオロロジー学会

<http://www.biorheology.jp>

日バイレオ誌 (B & R, 電子版) 第27巻 第2号

J. Jpn. Soc. Biorheol. 27(2) (2013)

# 第 36 回 日本バイオレオロジー学会年会 プログラム・抄録集



会期：平成 25 年 6 月 6 日（木），7 日（金），8 日（土）

年会長：工藤 奨  
九州大学 大学院 工学研究院 機械工学部門

会 場：九州大学 西新プラザ

問い合わせ先：九州大学大学院工学研究院 機械工学部門  
年会実行委員会 工藤 奨・中嶋和弘

## 実行組織

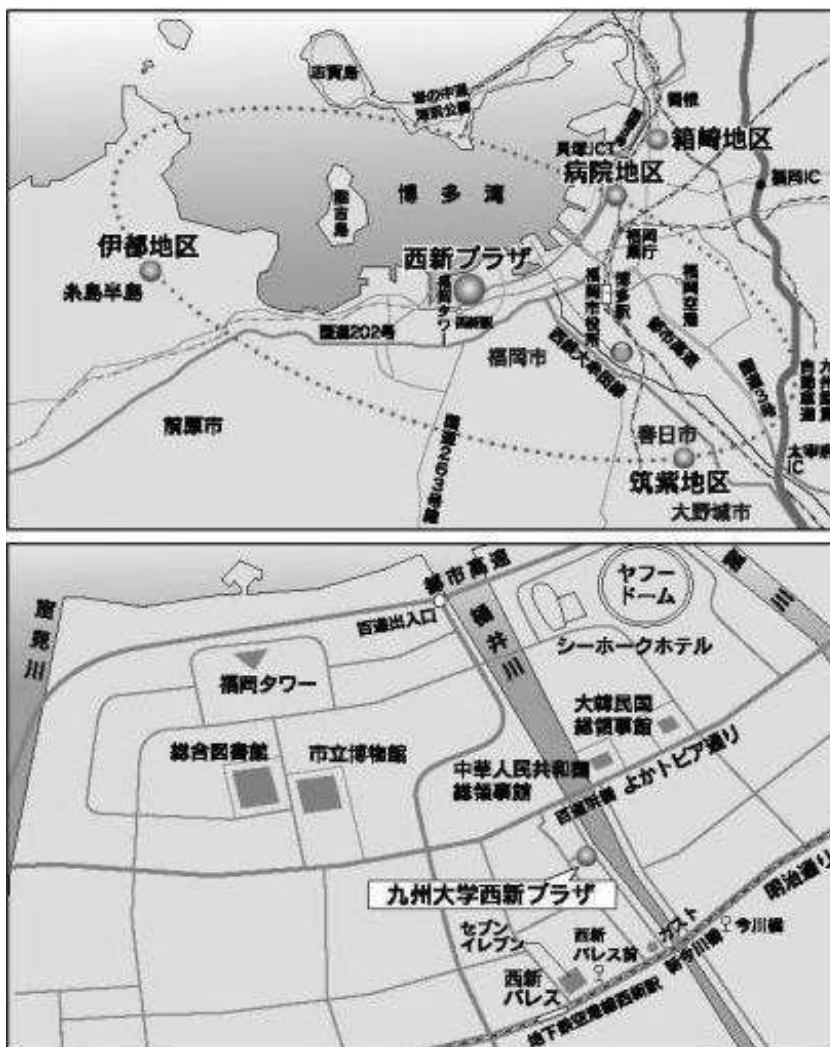
|       |       |      |
|-------|-------|------|
| 年会長   | 工藤 奨  | 九州大学 |
| 実行委員長 | 中嶋 和弘 | 九州大学 |
| 実行委員  | 高松 洋  | 九州大学 |
|       | 澤江 義則 | 九州大学 |
|       | 山口 哲生 | 九州大学 |

## 日本バイオレオロジー学会年会のあゆみ

| 回  | 年会長    | 所 属        | 会 場                  | 会 期           |
|----|--------|------------|----------------------|---------------|
| 1  | 深田 栄一  | 理化学研究所     | 東京慈恵会医科大学 高木会館講堂     | 1978/6/19     |
| 2  | 岡 小天   | 国立循環器病センター | 国立循環器病センター 講堂        | 1979/6/30～7/1 |
| 3  | 東 健彦   | 信州大学       | 信州大学 医学部第一講義堂        | 1980/6/28～29  |
| 4  | 谷口 興一  | 東京医科歯科大学   | 東京医科歯科大学 5号館         | 1981/6/20～21  |
| 5  | 梶谷 文彦  | 川崎医科大学     | 川崎医科大学 現代医学教育博物館     | 1982/6/26～27  |
| 6  | 稲垣 義明  | 千葉大学       | 千葉県文化会館 小ホール         | 1983/6/18～19  |
| 7  | 神谷 瞭   | 北海道大学      | 北海道自治会館 自治ホール        | 1984/6/16～17  |
| 8  | 浅野 牧茂  | 国立公衆衛生院    | 国立公衆衛生院 講堂           | 1985/6/15～16  |
| 9  | 志賀 健   | 愛媛大学       | 愛媛県医師会館 ホール          | 1986/6/11～13  |
| 10 | 磯貝 行秀  | 東京慈恵会医科大学  | 東京慈恵会医科大学 高木会館講堂     | 1987/6/13～16  |
| 11 | 松田 保   | 金沢大学       | 金沢大学 医学部十全講堂         | 1988/6/2～4    |
| 12 | 大島 宣雄  | 筑波大学       | 筑波大学 大学会館国際会議室       | 1989/7/5～7    |
| 13 | 峰下 雄   | 帝塚山短期大学    | 奈良県新公会堂              | 1990/6/21～23  |
| 14 | 品川 嘉也  | 日本医科大学     | 日本医科大学 大講堂           | 1991/6/20～22  |
| 15 | 平川 千里  | 岐阜大学       | 岐阜市文化センター            | 1992/6/25～27  |
| 16 | 菅原 基晃  | 東京女子医科大学   | 東京女子医科大学 弥生記念講堂      | 1993/6/16～17  |
| 17 | 松信 八十男 | 清和大学       | エーザイホール              | 1994/6/17～18  |
| 18 | 貝原 学   | 帝京大学       | TEPCO 地球館            | 1995/6/15～16  |
| 19 | 辻 隆之   | 国立循環器病センター | 千里ライフサイエンスセンター       | 1996/6/6～7    |
| 20 | 増田 善昭  | 千葉大学       | 千葉大学 けやき会館           | 1997/6/5～6    |
| 21 | 前田 信治  | 愛媛大学       | エスポワール愛媛文教會館         | 1998/6/11～13  |
| 22 | 貝原 真   | 理化学研究所     | 理化学研究所 鈴木梅太郎記念ホール    | 1999/6/10～11  |
| 23 | 辻岡 克彦  | 川崎医科大学     | 倉敷公民館                | 2000/6/8～9    |
| 24 | 谷下 一夫  | 慶應義塾大学     | 慶應義塾大学 創想館マルチメディアホール | 2001/6/7～8    |
| 25 | 大橋 俊夫  | 信州大学       | 信州大学 旭会館大会議室         | 2002/6/6～7    |
| 26 | 西成 勝好  | 大阪市立大学     | 大阪市立大学学術情報総合センター     | 2003/6/5～6    |
| 27 | 内村 功   | 東京医科歯科大学   | 東京医科歯科大学 特別講堂        | 2004/6/10～11  |
| 28 | 佐藤 正明  | 東北大学       | 東北大学 マルチメディア教育研究棟    | 2005/7/7～8    |
| 29 | 丸山 徹   | 九州大学       | 九州大学医学部 コラボステーション    | 2006/6/12～13  |
| 30 | 佐々木 直樹 | 北海道大学      | 北海道大学 学術交流会館         | 2007/6/14～15  |
| 31 | 安藤 譲二  | 東京大学       | 東京大学理学部 小柴ホール        | 2008/6/5～6    |
| 32 | 土橋 敏明  | 群馬大学       | 桐生市民文化会館             | 2009/6/4～5    |
| 33 | 氏家 弘   | 東京労災病院     | 理化学研究所 鈴木梅太郎記念ホール    | 2010/6/3～4    |
| 34 | 関 眞佐子  | 関西大学       | 関西大学 100周年記念会館       | 2011/6/3～4    |
| 35 | 佐藤 恵美子 | 新潟県立大学     | 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター  | 2012/5/31～6/2 |
| 36 | 工藤 奨   | 九州大学       | 九州大学 西新プラザ           | 2013/6/6～8    |



## 年会，総会，理事会，リサーチ・フォーラム会場へのアクセス



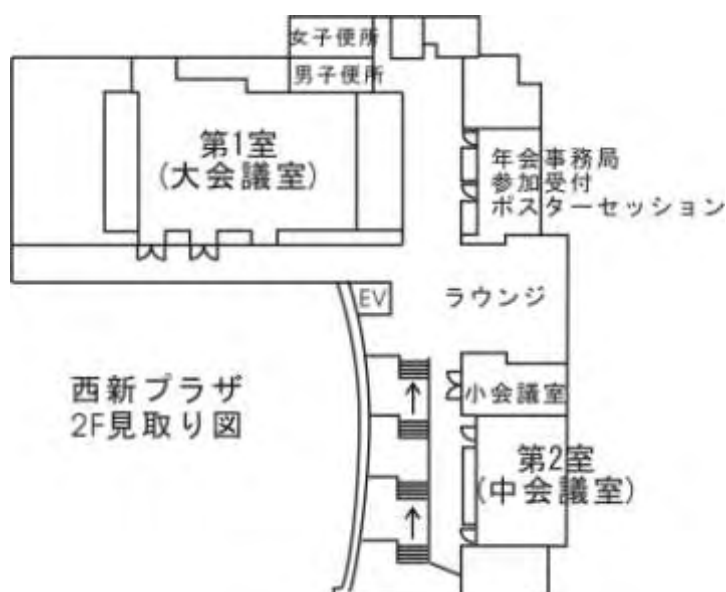
年会，フォーラム，理事会，各編集委員会会場：九州大学 西新プラザ

〒814-0002 福岡市早良区西新 2-16-23 TEL 092-831-8104 FAX 092-831-8105

福岡市営地下鉄「西新」駅下車、⑦番出口より徒歩約10分



年会，総会，理事会，リサーチ・フォーラム，各委員会会場  
2階 見取り図



|                               |        |        |
|-------------------------------|--------|--------|
| 年会会場                          | 第1会場   | : 大会議室 |
|                               | 第2会場   | : 中会議室 |
|                               | ポスター発表 | : 多目的室 |
| 総会                            |        | : 大会議室 |
| 理事会評議員会合同会議                   |        | : 中会議室 |
| 電子版 B&R 編集委員会                 |        | : 小会議室 |
| Vascular Engineering 出版打ち合わせ会 |        | : 小会議室 |
| リサーチ・フォーラム会場                  |        | : 中会議室 |
| 大会本部                          |        | : 多目的室 |

## 懇親会会場へのアクセス



懇親会会場： ヒルトン福岡シーホーク 34F タワーペントハウス

〒810-8650 福岡市中央区地行浜 2-2-3 TEL:092-844-8111

年会会場より貸切バスの送迎があります。

年会会場より徒歩 20 分

福岡市営地下鉄 西新・唐人町駅より徒歩約 19 分・タクシー約 6 分・バス約 6 分

## 交通のご案内

### ・九州大学西新プラザまでのアクセス

#### □鉄道を利用

JR 博多駅から、

○福岡市営地下鉄利用の場合

西唐津，筑前前原，姪浜，西新行きいずれかに乗車，「西新」駅下車（約 13 分，250 円）.

○タクシー利用の場合 JR 博多駅駅博多口タクシー乗り場より約 20～30 分

#### □飛行機を利用 福岡空港から

○福岡市営地下鉄「福岡空港」駅より乗車，「西新」駅下車（約 19 分，290 円）.

○タクシー利用の場合 福岡空港タクシー乗り場より約 30～40 分



## ご 案 内

- ご参加の皆様へ

受 付 時 間 : 6 月 7 日 (金) 8:40 より  
場 所 : 九州大学 西新プラザ 多目的室  
参加費 : 5,000 円 (会員) (参加費には, 講演抄録集 1 冊の代金が含まれます.)  
7,000 円 (非会員) (参加費には, 講演抄録集 1 冊の代金が含まれます.)  
3,000 円 (学生)  
講 演 抄 録 集 : 1,000 円  
懇 親 会 日 時 : 6 月 7 日 (金) 18:00~20:00  
場 所 : ヒルトン福岡シーホーク 34 階 タワーペントハウス  
参加費 : 正会員 5,000 円  
学生会員 2,000 円 (受付にてお申し込み下さい.)

- 会員の皆様へ

総会

開 催 日 時 : 6 月 8 日 (土) 11:00~11:30  
場 所 : 第 1 会場 (大会議室)

- 名誉顧問・名誉会員・理事・監事・評議員の皆様へ

理事会評議員会合同会議

開 催 日 時 : 6 月 6 日 (木) 13:00~15:30  
場 所 : 第 2 会場 (中会議室)

- バイオレオロジー・リサーチ・フォーラムご参加の皆様へ

開 催 日 時 : 6 月 6 日 (木) 16:00~18:00  
場 所 : 第 2 会場 (中会議室)

- 電子版 B&R 編集委員の皆様へ

電子版 B&R 編集委員会

開 催 日 時 : 6 月 7 日 (金) 11:50~12:40  
場 所 : 小会議室

- Vascular Engineering 執筆者の皆様へ

Vascular Engineering 出版打ち合わせ会

開 催 日 時 : 6 月 8 日 (土) 11:30~12:30  
場 所 : 小会議室

**● 口頭発表セッションの座長の皆様へ**

ご担当されるセッション開始時間の 10 分前までには次座長席にお着き下さい。活発な討論となりますようお願い申し上げます。

**● オーガナイズドセッション、シンポジウム、学会賞受賞講演 発表者の皆様へ**

- (1) オーガナイズドセッション、シンポジウムおよび学術奨励賞応募講演の発表時間は 8 分、討論は 4 分です。学会賞受賞講演につきましては、別途ご連絡いたします。
- (2) 各演者は、発表時間の 30 分前までに受付をお済ませ下さい。
- (3) 会場には、液晶プロジェクターとレーザーポインター、およびマイクをご用意いたします。
- (4) 各演者は前演者が発表している間に次演者席にお着き下さい。

**機器の使用について**

1. 各演者はご自身のコンピュータを接続して下さい。会場にはコンピュータを用意致しませんので、各自でコンピュータをご用意ください。
2. コンピュータの操作は、発表者自身または共同演者で行ってください。
3. 会場には、プロジェクターとの接続コードとしてミニ D-Sub 15 ピン（オス）のケーブルを用意します。（下図参照）出力端子がこれに合わない場合はアダプタをご持参下さい。また音声は会場スピーカーへの直接出力は準備しておりません。音声ご使用の際は、演者用マイクを近づけるなどして下さい。
4. ノートパソコンは機種によって、端子の形状や操作の異なる場合があります。ご自身のパソコンを熟知した上でお越し下さい。
5. 接続したコンピュータは、電源を切ったりサスペンドの状態などにしたりはしないで、すぐに発表ができる状態にしておいてください。
6. 接続トラブル等による発表時間の延長は認められません。講演開始前の休憩時間に、予め試写をしていただきますようお願いいたします。



プロジェクター・パソコン接続用ケーブル端子（D-sub 15 ピン）

### ● ポスター発表者の皆様へ

- (1) ポスターの掲示は、6 月 8 日（金）12:00 までに、指定場所（多目的室）に貼りつけてください。（ピンなどは年会にて用意します。）
- (2) ポスターセッションは、6 月 8 日（金）14:15～14:45 です。セッション中は、ポスターの前に立ち、聴衆に対して説明と質疑応答を行ってください。
- (3) ポスター発表では、登壇しての発表はありませんが、ポスターセッション中に、演題毎に座長を割り当て、コアタイムを設定します。コアタイムになれば、座長の指示に従い、ポスターの前で 5 分程度の説明と 2 分程度の質疑応答を行ってください。なお発表時間および座長については、ポスター掲示用パネル上部に貼り付けてある演題番号下にも記載してあります。
- (4) ポスター前で PC などを使いながら説明をすることも可能ですが、電源は用意していません。
- (5) ポスターは、6 月 8 日（土）の 15:00 以降に撤去してください。なお 6 月 8 日（土）の 17:00 を過ぎて放置されているポスターは、年会事務局にて処分します。

### ポスターの作成について

1. ポスターを貼り付けるパネルのサイズは、ヨコ 110cm×タテ 210cm です。このパネルのサイズに収まるよう、ポスターを作成してください。演題番号は年会でパネル左上端に貼っておきます。（下左図参照）
2. 文字や図表のサイズ、レイアウトを工夫し、離れたところからでもわかりやすいポスターを作成することを心がけてください。
3. 「目的」・「方法」・「結果」・「結論」などを明確にし、目的は左上部に、結論は右下部になるように配置してください。（下右図参照）
4. タイトル・発表者氏名・所属に続いて代表者の連絡先メールアドレスを記入してください。

**第36回バイオレオロジー学会年会 ポスターセッション  
ーポスターの作成について(例)ー**

○中嶋和弘\*.\*\*, 隅井干城\*\*\*, 荒井雅隆\*\*\*, 工藤 奨\*

\*九州大学 大学院 工学研究院 機械工学部門  
\*\*九州大学 バイオメカニクス研究センター  
\*\*\*九州大学 大学院 工学府 機械工学専攻  
連絡先: web@biorheology.jp

---

講演タイトル  
筆者(発表者に○を付す)  
所属  
連絡先(代表者のメールアドレス)

}

これら情報はかならず記載すること



以下、発表内容を

1. 緒言・目的
2. 実験装置および方法
3. 結果
4. 考察
5. 結論

等、項目に分けて記載  
(できる限り緒言・目的は左上部、結語は右下部になるように配置する)

フォントサイズ等については、特に指定しませんが、聴講者が読みやすいように比較的大きめのサイズにしておいてください。

ポスターの作成例

## バイオレオロジー・リサーチ・フォーラムのご案内

6 月 6 日（木）16:00～18:00 第 2 会場（中会議室）

司会：工藤 奨（九州大）

「細胞操作技術の新展開」

1. 「細胞操作メカノバイオマテリアル」

木戸秋 悟

（九州大学 先端物質化学研究所）

2. 「電界誘起気泡メスによる細胞加工・インジェクション技術」

山西 陽子

（芝浦工業大学 工学部 機械工学科）

## 特別講演のご案内

6 月 7 日（金）13:50～14:50 第 1 会場

司会：工藤 奨（九州大）

「生体関節におけるバイオレオロジー」

村上輝夫（九州大学）

## Japan – Korea Joint Symposiumのご案内

6 月 7 日（金）15:00～17:30 第 1 会場

Chair：Toshiaki Dobashi (Gunma University)

Keynote Lecture 1

INTEGRATED MICROFLUIDIC SYSTEM FOR HEMORHEOLOGICAL MEASUREMENTS: PLATELET AGGREGATION

Sehyun Shin (Korea University)

Keynote Lecture 2

BIORHEOLOGICAL ASPECT OF MICROVESSEL FORMATION

Kazuo Tanishita (Waseda University)

Chair：Masako Seki (Kansai University)

Keynote Lecture 3

THE ROLE OF CRITICAL SHEAR STRESS ON ACUTE CORONARY SYNDROME

Byoung Kwon Lee (Yonsei University College of Medicine)

Keynote Lecture 4

VASCULAR MECHANOBIOLOGY: FLOW DETECTION AND CALCIUM SIGNALING IN ENDOTHELIAL CELLS

Kimiko Yamamoto (The University of Tokyo)

## 岡小天賞・論文賞受賞講演のご案内

6 月 8 日（土）12:30～14:00 第 1 会場（大会議室）

司会：大橋俊朗（北海道大），山本 希美子（東京大）

岡小天賞受賞講演

## 学術奨励賞応募講演のご案内

6 月 7 日（金）10:20～11:44 第 1 会場（大会議室）

座長： 佐々木直樹（北海道大），工藤 奨（九州大）

優れた研究発表をした若手の日本バイオレオロジー学会会員を顕彰します。応募者の本セッションでの発表に対する審査員の評点で，学術奨励賞受賞論文を決定します．年会 3 日目の総会で受賞論文名を発表し，受賞者には賞状および副賞として金一封を授与します．



## 第 36 回日本バイオレオロジー学会年会プログラム

○印：口頭発表登壇者，またはポスター発表の発表者

### 第 1 日目 6 月 6 日（木）

#### **第 2 会場**

16:00～18:00 バイオレオロジー・リサーチフォーラム

司会： 工藤 奨（九州大）

「細胞操作技術の新展開」

1 細胞操作メカノバイオマテリアル

○木戸秋 悟（九州大学 先導物質化学研究所）

2 電界誘起気泡メスによる細胞加工・インジェクション技術

○山西 陽子（芝浦工業大学 工学部 機械工学科）

**第 2 日目 6 月 7 日（金）****第 1 会場**

- 9 : 10 ~ 10 : 10      OS7 : ヘルスケア食品レオロジー      p.27~31  
 座長 : 市川 寿 (長崎大), 吉村美紀 (兵庫県立大), 佐藤恵美子 (新潟県立大)
- OS7-1 しめ鯖づくりと体積相転移現象  
 川口美咲 (長崎大), ○市川 寿
- OS7-2 ゲル強度に優れた魚鱗由来熱水抽出ゼラチンのキャラクタリゼーション  
 岡 智子 (長崎大), Wang Xi, ○市川 寿, 関口拓磨 (群馬大), 近藤信吾, 槇 靖幸, 土橋敏明
- OS7-3 スケトウダラすり身の低温ゲル化過程のレオロジー特性  
 ○金田 勇 (酪農学園大), 青沼航平, 船津保浩
- OS7-4 コーンスターチゲルのレオロジー特性に及ぼす米粉添加の影響  
 ○佐藤恵美子 (新潟県立大), 佐竹妙子
- OS7-5 トマトゼリーの食味と物性に関する研究 – 高齢者と若年者の比較 –  
 ○筒井和美 (愛知教育大), 深川琴恵, 田村朝子 (新潟県立大), 荒井富佐子, 宮西邦夫, 佐藤恵美子, 廣神里奈, 早瀬和利 (愛知教育大), 西成勝好 (湖北工業大), 金巻栄作 (金巻屋), 二瓶英子 (有明ハイツ), 秋間美也子
- 10 : 20 ~ 11 : 44      学術奨励賞応募講演      p.32~38  
 座長 : 佐々木直樹 (北海道大), 工藤 奨 (九州大)
- A-1 単一赤血球変形能診断システム開発へ向けた実験装置の試作とその動作検証  
 ○都築達也 (芝浦工業大), 渡邊宣夫
- A-2 プリオンタンパク質におけるアミロイド性集合体を防止する作用機序の解明  
 ○佐伯政俊 (山口東京理科大), 森井尚之 (産業技術総合研究所), 橋本慎二 (山口東京理科大)
- A-3 光学顕微鏡による熱拡散現象の直接的観測法の開発  
 ○村田飛鶴 (東海大), 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋
- A-4 小型 FALLING NEEDLE RHEOMETER を用いた血液の流動特性の解析  
 ○鈴木貴雅 (関西大), 山本秀樹, 川村公人 (アサヒグループホールディングス株式会社), Dominik Bernitzky (Medical University of Vienna), Roberto Plasenzotti
- A-5 温度勾配による糖およびエチレングリコール水溶液の輸送現象  
 ○前田晃作 (東海大), 篠原春香, 喜多理王, 新屋敷直木, 八木原晋
- A-6 局所的に非一様な粒子群中の透過流動  
 ○大友涼子 (関西大), 原田周作 (北海道大)
- A-7 摩擦負荷培養法による再生軟骨組織形成とその力学特性に関する研究

○福田圭祐（九州大学），澤江義則，小俣誠二

12 : 40～13 : 16 OS1 : 血管障害と流体力学 p.39～41

座長：田地川勉（関西大）

OS1-1 Flow Diverter(FD)を留置した脳動脈瘤内の血流シミュレーション

○鈴木貴士（東京理科大），高尾洋之（東京慈恵会医科大），石橋敏寛，増田俊輔，門倉 翔（東京理科大），Ashraf Mohamed（東京慈恵会医科大），銭 逸（マッコーリ大），山本 誠（東京理科大），村山雄一（東京慈恵会医科大）

OS1-2 拍動流中にある弾性壁動脈瘤モデルの壁せん断応力の変動

○山口隆平（芝浦工業大），氏家 弘（東京労災病院）

OS1-3 脳動脈瘤内の血流に及ぼすステントの影響

○増田俊輔（東京慈恵会医科大，サイバネットシステム），高尾洋之（東京慈恵会医科大），鈴木貴士，門倉 翔（東京理科大），モハメドアシュラフ（東京慈恵会医科大），銭 逸（マッコーリ大），山本誠（東京理科大），村山雄一（東京慈恵会医科大）

13 : 50～14 : 50 特別講演 p.22

司会：工藤 奨（九州大）

生体関節におけるバイオレオロジー

○村上輝夫（九州大）

15 : 00～17 : 30 日韓シンポジウム Japan-Korea Joint Symposium p.23～26

Chair : Toshiaki Dobashi (Gunma University)

S-1 INTEGRATED MICROFLUIDIC SYSTEM FOR HEMORHEOLOGICAL MEASUREMENTS: PLATELET AGGREGATION

○Sehyun Shin (Korea University)

S-2 BIORHEOLOGICAL ASPECT OF MICROVESSEL FORMATION

○Kazuo Tanishita (Waseda University), Yoshinori Abe (Keio University), Mariko Ikeda (Keio University)

Chair : Masako Seki (Kansai University)

S-3 THE ROLE OF CRITICAL SHEAR STRESS ON ACUTE CORONARY SYNDROME

○Byoung Kwon Lee (Yonsei University College of Medicine), Sehyun Shin (Korea University)

S-4 VASCULAR MECHANOBIOLOGY: FLOW DETECTION AND CALCIUM SIGNALING IN ENDOTHELIAL CELLS

○Kimiko Yamamoto (The University of Tokyo), Joji Ando (Dokkyo Medical University)

## 第 2 会場

9 : 10～10 : 10 OS5 : ティッシュエンジニアリング・人工臓器(1) p.42～46

座長：岩崎清隆（早稲田大）

- OS5-1 血液凝固能および血小板凝集能からみた抗血栓性コーティングの特性に関する研究  
○水野敏秀（国立循環器病研究センター研究所），山岡哲二，築谷朋典，武輪能明，巽 英介
- OS5-2 低侵襲体外循環を目指した低充填量回路の作製 -ラット体外循環モデルを用いた評価-  
○藤井 豊（国立循環器病研究センター研究所），巽 英介，白井幹康，武輪能明，妙中義之
- OS5-3 空気圧駆動式人工心臓用小型駆動装置のための空気流量を利用した拍出流量モニタに関する実験的検討  
○大沼健太郎（国立循環器病研究センター研究所），本間章彦（東京電機大），住倉博仁（国立循環器病研究センター研究所），築谷朋典，武輪能明，水野敏秀，向林宏（株式会社イワキ），小嶋孝一，片野一夫（東京電機大），妙中義之（国立循環器病研究センター研究所），巽 英介
- OS5-4 表面粗さを付加した回転せん断負荷装置内全体の血流解析  
○西田正浩（産業技術総合研究所），工藤大樹（茨城大），丸山 修（産業技術総合研究所），山根隆志（神戸大），松田健一，増澤 徹（茨城大）
- OS5-5 循環器系人工臓器の粘弾性学的血液適合性評価  
○丸山 修（産業技術総合研究所），可児裕基（東京理科大），小阪 亮（産業技術総合研究所），西田正浩，山根隆志（神戸大），巽 英介（国立循環器病研究センター研究所），妙中義之

12 : 40～13 : 28

OS5 : ティッシュエンジニアリング・人工臓器(2)

p.47～50

座長：西田正浩（産業技術総合研究所）

- OS5-6 自己組織心臓代用弁（バイオバルブ）の生体外機能評価  
○住倉博仁（国立循環器病研究センター研究所），中山泰秀，大沼健太郎，武輪能明，巽 英介
- OS5-7 浮遊攪拌培養法による ES 細胞の未分化維持培養に関する検討  
○水本博（九州大），導寺香奈，網本直記，梶原稔尚
- OS5-8 PVA ハイドロゲルの変形特性と摩擦特性  
○中嶋和弘（九州大），鎗光清道，澤江義則，村上輝夫
- OS5-9 石灰化マルチチャネルコラーゲンゲルを用いた多階層構造を持つ再生骨組織の構築  
安井 憲（北海道大），○古澤和也，福井彰雅，佐々木直樹

### 第 3 日目 6 月 8 日（土）

#### **第 1 会場**

9 : 00～9 : 48

OS6 : 生体物質の構造形成と機能発現・制御(1)

p.52～55

座長：喜多理王（東海大）

- OS6-1 低摩擦ハイドロゲルにおける応力-拡散結合

○山口哲生（九州大），村上輝夫

OS6-2 リン脂質二分子膜リポソームの変形とリン脂質単分子膜の凝集状態

横尾麻衣（佐賀大），黒田修未，○成田貴行，大石祐司

OS6-3 醤油・アルギン酸ペーストの粘弾性挙動

○松田夏希（佐賀大），井上侑子，Saphwan Al-Assaf (Glyndwr Univ)，大石祐司（佐賀大），成田貴行

OS6-4 ゼラチンゲルのレオロジーとヘリックス形成

○槇 靖幸（群馬大），渡部 翔，矢島一樹，松尾光一（広島大）

10 : 00～10 : 48 OS6 : 生体物質の構造形成と機能発現・制御(2)

p.56～59

座長：山口哲生（九州大）

OS6-5 マルチチャネルコラーゲンゲルの階層構造に与える温度の影響

○古澤和也（北海道大），花崎洋平，増元淳一，福井彰雅，佐々木直樹

OS6-6 DNA-陽イオン界面活性剤複合体フィルムの構造と物性

○佐々木直樹（北海道大），E. C. Ossai，岡田昂樹，大木翔太，古澤和也，福井彰雅

OS6-7 蠕動運動による腸内気泡の運動

○多羅尾範郎（聖隷クリストファー大）

OS6-8 気管支分岐付近での痰塊表面の剥離

○多羅尾範郎（聖隷クリストファー大）

12 : 30～14 : 00 岡小天賞・論文賞受賞講演

司会：大橋俊朗（北海道大），山本 希美子（東京大）

15 : 00～16 : 12 OS4 : 細胞・分子のメカノバイオロジー

p.60～65

座長：大橋俊朗（北海道大），安達泰治（京都大）

OS4-1 マイクロチャネルデバイスを用いた細胞遊走時の牽引力計測

○大橋俊朗（北海道大），菅原章人，Justin Cooper-White (The University of Queensland)

OS4-2 AFM を用いたアクチンフィラメントの曲率依存的な ARP2/3 との相互作用変化測定

○韓 成雄（京都大），森田恭平，安達泰治

OS4-3 細胞のマクロ形態とナノ構造の力学的制御

○出口真次（東北大），松井 翼，齋藤 明，佐藤正明

OS4-4 間質流制御による 3 次元血管ネットワークの形成

阿部順紀（慶應義塾大），谷下一夫（早稲田大），○須藤 亮（慶應義塾大）

OS4-5 低酸素環境下でのニューロン活性化が脳血管へ与える影響

○荒井雅貴（九州大），佐藤竜也（芝浦工業大），工藤 奨（九州大）

OS4-6 肝星細胞の遊走における力学刺激と受容体の関連性

○隅井干城（九州大），藤田陵佑（芝浦工業大），岩下 洸，工藤 奨（九州大）

p.66~69

○柴田政廣（芝浦工業大），濱島早紀，川村彩智

**ポスター発表会場**

14 : 15～14 : 45 ポスターセッションコアタイム(1)

p.78～81

座長：須藤 亮（慶應義塾大）

- P-1 高イオン強度下でのフィブリン凝集に対する糖鎖切除効果  
○窪田健二（群馬大），外山吉治，行木信一，落合正則（北海道大）
- P-2 DYNAMIC SHEAR RESPONSES OF POLYMER-POLYMER INTERFACES  
○名嘉山祥也（九州大），梶原稔尚
- P-3 血管内皮細胞内 PKC $\alpha$ の局在変化におよぼす局所引張の影響  
○隅井干城（九州大），木村恭彰（芝浦工業大），島田知弥，土屋宏紀，工藤奨（九州大）
- P-4 せん断応力負荷時の血管内皮細胞内アクチン局在特性  
○荒井雅貴（九州大），寺田麻理枝（芝浦工業大），工藤奨（九州大）

14 : 15～14 : 45 ポスターセッションコアタイム(2)

p.82～85

座長：出口真次（名古屋工業大）

- P-5 チョウザメ由来アテロコラーゲンのゲル化に伴う粘弾性変化  
○関口拓磨（群馬大），榎 靖幸，近藤信吾，土橋敏明，元村まみ（長崎大），市川 寿，小柳佳子（北海道大），岸村栄毅，安部智貴，足立伸次，都木靖彰
- P-6 豆乳・米粉混合ゲルの酸凝固  
○吉村美紀（兵庫県立大），江口智美，東羅あかね，中川究也
- P-7 うどん麺のテクスチャーに及ぼす投入温度とタピオカ澱粉配合の影響  
○江口智美（兵庫県立大），山本美晴，吉村美紀
- P-8 飲料中亜硝酸の還元による NO 産生  
小川武人（川崎医療福祉大），○望月精一



## 年会タイムテーブル

### 第 1 日目 6 月 6 日（木）

| 第 1 会場（大会議室） | 第 2 室（中会議室）                                       |
|--------------|---------------------------------------------------|
|              | 13:00～15:00<br>理事会評議員会合同会議                        |
| 休憩           |                                                   |
|              | 16:00～18:00<br>バイオレオロジー・リサーチフォーラム<br>「細胞操作技術の新展開」 |

### 第 2 日目 6 月 7 日（金）

| 第 1 会場（大会議室）                               | 第 2 室（中会議室）                                      |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 9:10～10:10 OS7 p.27～31<br>ヘルスケア食品レオロジー     | 9:10～10:10 OS5 p.42～46<br>ティッシュエンジニアリング・人工臓器(1)  |
| 休憩（10 分）                                   |                                                  |
| 10:20～11:44 p.32～38<br>学術奨励賞応募講演           |                                                  |
| 11:44～12:40<br>昼食                          | 11:50～12:40<br>電子版 B&R 編集委員会                     |
| 12:40～13:16 OS1 p.39～41<br>血管障害と流体力学       | 12:40～13:28 OS5 p.47～50<br>ティッシュエンジニアリング・人工臓器(2) |
| 休憩（22 分）                                   |                                                  |
| 13:50～14:50 p.22<br>特別講演「生体関節におけるバイオレオロジー」 |                                                  |
| 休憩（10 分）                                   |                                                  |
| 15:00～17:30 p.23～26<br>日韓シンポジウム            |                                                  |
| 移動（30 分）                                   |                                                  |
| 18:00～20:00<br>懇親会（ヒルトン福岡シーホーク）            |                                                  |

## 第 3 日目 6 月 8 日（土）

| 第 1 会場（大会議室）                                                | 第 2 会場（中会議室）                                 |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 9:00～9:48 OS6 p.52～55<br>生体物質の構造形成と機能発現・制御(1)               | 9:00～9:48 OS2 p.66～69<br>循環器ダイナミクスと疾患        |
| 休憩（12 分）                                                    |                                              |
| 10:00～10:48 OS6 p.56～59<br>生体物質の構造形成と機能発現・制御(2)             | 10:00～10:48 OS3 p.70～73<br>血液レオロジーと微小循環(1)   |
| 休憩（12 分）                                                    |                                              |
| 11:00～11:30<br>総会                                           |                                              |
| 11:30～12:30<br>昼食                                           | 11:30～12:30<br>Vascular Engineering 出版打ち合わせ会 |
| 12:30～14:00<br>学会賞受賞講演                                      |                                              |
| 休憩（15 分）                                                    |                                              |
| 14:15～14:45 p.78～85<br>ポスターセッション（多目的室）<br>コアタイム 14:15～14:43 |                                              |
| 休憩（15 分）                                                    |                                              |
| 15:00～16:12 OS4 p.60～65<br>細胞・分子のメカのバイオロジー                  | 15:00～15:48 OS3 p.74～77<br>血液レオロジーと微小循環(2)   |

## 第 2 日目

6 月 7 日(金)

# 生体関節におけるバイオレオロジー

村上輝夫\*

\* 九州大学 バイオメカニクス研究センター[〒819-0395 福岡市西区元岡 744]

## 1. 緒言

生体関節（図 1）は、筋骨格系における円滑な運動や長期にわたる荷重支持を可能とする重要な役割を担っている。骨端部の表層は高含水の軟骨組織により被覆され、潤滑性を有する関節液による潤滑作用を受けている高機能の軸受に相当する。「生体および生体を構成する物質の流動と変形の科学」と定義されるバイオレオロジーの視点から考察すると、流動と変形という現象を巧みに活かした器官とみなされる。生体関節を流動と変形という視点から紹介する。

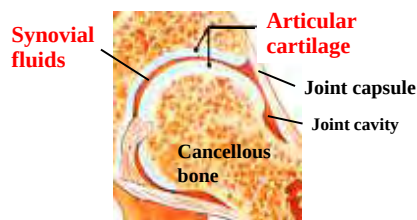


Fig.1 Model of hip joint<sup>1)</sup>

## 2. 生体関節における流動現象

**2. 1 関節液の流動現象** 関節液は、高分子量ヒアルロン酸と血清希釈成分を含有しており、顕著な非ニュートン性を有する粘性液体として知られ、いわゆる流体潤滑膜の形成や境界潤滑に寄与し、栄養補給媒体としても機能している。低せん断速度時には高粘性 ( $1 \text{ s}^{-1}$  で  $1 \text{ Pa} \cdot \text{s}$  以上)により粘性膜を維持し、歩行時などの高せん断速度時には粘度を低減させ ( $10^{5-6} \text{ s}^{-1}$  で数  $\text{m Pa} \cdot \text{s}$  程度)、粘性抵抗を低減し低摩擦の維持に寄与している。一方で、粘弾性効果を呈し、法線応力の発生も観測されている。多成分系である関節液では、成分間の相互作用が粘性挙動に強く影響する場合があります、模擬関節液の選定などでは留意する必要がある。

流体潤滑では関節液によるくさび膜やスクイズ膜による動圧発生が荷重支持と低摩擦に寄与する。

**2. 2 固液二相軟骨組織における流動** 生体関節軟骨はコラーゲン線維とプロテオグリカン、軟骨細胞から構成され、70～80%の水分を含むため固液二相性材料に相当し、軟骨内の液体流動をとまなう複雑な粘弾性挙動を示す。流体の保持と、流出入が後述の変形挙動にも大きい影響を有する。

## 3. 生体関節における変形現象

関節軟骨は、骨端部海綿骨の表層を被覆する高含水性の固液二相軟質層でありコラーゲン線維で強化された傾斜構造組織（図 2）である。軟骨は圧縮荷重を受けながら摩擦運動を行うが、軟質であり負荷時には海綿骨と相まった弾性変形により面圧を低下するとともに弾性流体潤滑膜形成に寄与する。また、とくに動的な圧縮荷重に対しては、間隙液体圧力が荷重の大部分を支持するために軟骨組織の変形は最小限に抑えられ、摩擦も低く維持され、その機構は固液二相潤滑と称される。ここでは、コラーゲン線維によるばね作用や深さ方向の弾性率の変化（表層は深層の 1/20 程度の圧縮弾性率）や透過率の圧密特性が液相荷重支持率の維持に寄与する。

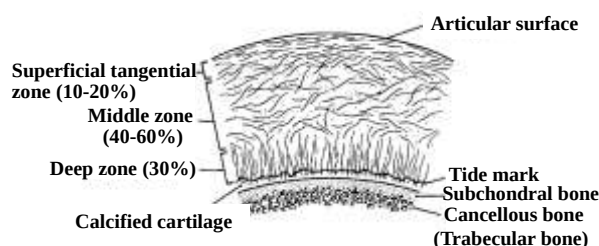


Fig.2 Model of articular cartilage structure<sup>2)</sup>

## 4. 関節における潤滑機構<sup>3)</sup>

体重の数倍の荷重を受ける下肢関節でも、摩擦係数 0.01 以下の低摩擦を維持し、優れた低摩耗性により生涯にわたり機能を維持する。そこでは、多様な動作条件に対応して種々の潤滑機能を維持する多モード適応潤滑機構が重要な役割を果たしている。生体軟骨を規範にしたハイドロゲル人工軟骨の開発に関する科研特別推進研究 (23000011) の事例を含めて研究動向を紹介する。

## 文 献

- 1) 岡正典編集：人工関節・バイオマテリアル，メジカルビュー社，1990，p. ii (口絵) (一部加筆)。
- 2) Mow, V.C. et al. : Biphase and Quasilinear Viscoelastic Theories for Hydrated Soft Tissues, In Biomechanics of Diarthrodial Joints, Vol.1, V.C. Mow et al (Ed), Springer-Verlag, 1990, 215-260.
- 3) 村上輝夫：生体関節と人工関節のバイオトライボロジー，「バイオメカニクスの最前線」，佐藤正明，出口真次，安達泰治，村上輝夫，廣川俊二著，共立出版，2013，pp. 167-226.

# INTEGRATED MICROFLUIDIC SYSTEM FOR HEMORHEOLOGICAL MEASUREMENTS: PLATELET AGGREGATION

Sehyun Shin\*

\*School of Mechanical Engineering, Korea University [Anam-dong Seongbuk-gu Seoul, 136-713, KOREA]

## 1. Introduction

Platelet aggregation and adhesion, both of which play critical roles in hemostasis and thrombosis at sites of vascular injury occur through complex signaling mechanisms associated with vascular subendothelial matrix proteins (i.e., collagen), biochemical activators in blood (i.e., thrombin, adenosine diphosphate [ADP], and von Willebrand factor [vWF]), and hemodynamic factors (i.e., shear stress and shear rate).<sup>6-8</sup> Among these factors, shear stress influences all processes directly or indirectly and therefore should be accounted for in any in vitro platelet analysis. This has long presented a challenge in the development of new testing methods for examining platelet function.

In this study, we developed a microfluidic system that provides a simple and rapid assay for shear-induced platelet aggregation and adhesion. As a proof of principle, we demonstrated shear-dependent platelet aggregation and adhesion by measuring the difference in migration distance (MD) of blood samples in a 2-channel microchip. The system performance was evaluated and optimized at room temperature and vacuum pressure using varying agonist concentrations and stirrer rotation speeds.

## 2. Methods

The present study adopts a microfluidic system with rotating-stirrer for the platelet function assay. The system consists of a micro-chamber coated with ADP, entrance microchannels coated with collagen, the main microchannel section, a solenoid valve, and a syringe pump. The ADP-coated microchamber includes a stirrer that can be remotely rotated by a magnet mounted on a rotor. The rotating speed of the stirrer, which is carefully controlled by the motor, ranges from 700 to 3500 rpm (the corresponding shear rates are 900–4500 s<sup>-1</sup>). Because of the characteristics of a rotating stirrer, the generated shear rates are intermittently applied on platelets. Therefore, the stirring time is extended to 3 min so that all platelets are fully exposed to each shear rate and activated.

## 3. Results

We demonstrated migration distance (MD) with varying rotational speed. The present results show the shear-dependence of platelet activation and adhesion via the MD through the microchannel. MDs for blood exposed to various shear rates between 0 and 4500 s<sup>-1</sup> were monitored results. As the shear rate increased from 0 to 1800 s<sup>-1</sup>, MD rapidly decreased until it reached an asymptotic value between 1800 and 3600 s<sup>-1</sup>. Further increase in shear rate resulted in an increase in MD.

## 4. Discussion

The shear-dependent characteristics of MD can be delineated with degree of platelet activation. In other words, extent of platelet activation may be proportional to the magnitude of shear rates, in which case, the gradual decrease in MR would be due to the intrinsic shear-dependence of the platelets. This hypothesis was verified with FACS analysis with counting activated platelets. Thus, the present rotating stirrer in a microchamber generated shear rates, which can effectively activate platelets. Also, activated platelets were adhered and aggregated on the collagen-coated surface and resulted in shear-dependent migration distance.

## References

- 1) W. S. Nesbitt, E. Westein, F. J. Tovar-Lopez, E. Tolouei, A. Mitchell, J. Fu, J. Carberry, A. Fouras, S. P. Jackson: A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation, *Nature Medicine*, **15**, 665-675, 2009
- 2) Y. Miyazaki, S. Nomura, T. Miyake, H. Kagawa, C. Kitada, H. Taniguchi, Y. Komiyama, Y. Fujimura, Y. Ikeda, S. Fukuhara: High Shear Stress Can Initiate Both Platelet Aggregation and Shedding of Procoagulant Containing Microparticles, *Blood*, **88**, 3456-3464, 1996.
- 3) F. J. Tovar-Lopez, G. Rosengarten, E. Westein, K. Khoshmanesh, S.P. Jackson, A. Mitchell, W.S. Nesbitt: A microfluidics device to monitor platelet aggregation dynamics in response to strain rate micro-gradients in flowing blood, *Lab Chip*, **10**, 291–302, 2010.

# BIORHEOLOGICAL ASPECT OF MICROVESSEL FORMATION

Kazuo Tanishita\*, Ryo Sudo\*\*, Yoshinori Abe\*\* and Mariko Ikeda\*\*

\* Institute for Nanoscience and Nanotechnology, Waseda University, [Shinjyuku-ku, Tokyo, 162-0041, JAPAN]

\*\* faculty of science and technology, Keio University, [Kohoku-ku, Yokohama, 223-8522, JAPAN]

## 1. Introduction

The vessel network formation is essentially required to achieve the function of reconstructed 3D cellular structure. Here we focused on the procedure of the tube formation of blood vessels induced with biomechanical environments, including the external mechanical stimuli to the cells and mechanical surroundings such as the mechanical properties of ECM. Thus we clarified the effect of shear stress stimulus on three-dimensional microvessel formation in vitro. Furthermore we focused on the effects of the mechanical properties of collagen gel on the formation of 3D capillary-like networks within these gels.

## 2. Methods

Bovine pulmonary microvascular endothelial cells (ECs) were seeded onto collagen gels to make a microvessel formation model. The shear stress was applied on the surface of confluent layer of ECs and 3D structure of microvessel formation was observed by the phase-contrast microscopy, confocal laser scanning microscopy and electron microscopy. Furthermore bovine pulmonary microvascular ECs were cultured on a series of collagen gels of different stiffness but the same collagen concentration. The 3D structures of the networks were examined using confocal laser scanning microscopy.

## 3. Results and Discussion

The results show that cells invaded the collagen gel and reconstructed the tubular structures, containing a clearly defined lumen consisting of multiple cells. Furthermore the shear stress applied to the surfaces of endothelial cells on collagen gel promotes the growth of microvessel network formation in the gel and

expands the network because of repeated bifurcation and elongation. We also found that spatial distribution of lamellipodia formed in the tip of the 3-D networks promoted the network extension under the influence of shear stress applied.

Imaging technique revealed that cells cultured in rigid and flexible gels formed 3D networks via different processes. In the flexible gel, most cells invaded the gel beneath the cell monolayer and formed thin dense networks. In contrast, cells in the rigid gel invaded into the gel as clumps and formed thick networks that were sparsely distributed. Cells in the rigid gel formed much deeper networks than those formed in the flexible gel, with some reaching about 120  $\mu\text{m}$  beneath the gel surface.

Cross-sections of the networks revealed that those formed within the rigid gel had large lumens composed of multiple cells, whereas those formed within the flexible gel had small, intracellular vacuoles. Our results indicate that the mechanical properties of adhesion substrates play an important role in regulating 3D network formation in vitro. In particular, our findings are important when ECs are cultured with other cells types such as hepatocytes and cardiovascular cells in 3-D substrates.

## References

- 1) A. Ueda et al., *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol.287, PP. H994-H1002, 2004.
- 2) Y. Abe et al., *Trans. JSME*, Vol.76, pp.1061-1067, 2010
- 3) N. Yamamura et al. *Tissue Engineering*, Vol. 13, PP.1443-1453, 2007

# THE ROLE OF CRITICAL SHEAR STRESS ON ACUTE CORONARY SYNDROME

Byoung Kwon Lee\*, Sehyun Shin\*\*

\*Department of Internal Medicine, Gangnam Severance Hospital, Yonsei University [211 Eonju-ro, Gangnam-gu, Seoul 135-720, Korea.]

\*\*Department of Mechanical Engineering, Korea University [Anam-dong 5ga, Seongbuk-gu, Seoul 136-713, Korea]

## 1. Introduction

Red blood cell (RBC) aggregation is major determinant of whole blood viscosity at a low shear rate. Increased aggregation of RBC is associated with many vascular diseases [1]. To understand RBC aggregation mechanism and its physiological importance, a variety of indexes have been proposed. Recently, critical shear stress (CSS) by simultaneous measurement of electrical impedance, capacitance and light backscattering has developed, and is suggested as an index of RBC aggregability [2]. CSS is defined as either the minimum shear-stress required dispersing the aggregates. Therefore, we hypothesized that higher value of CSS might be associated increased thrombosis in ACS. The objective of this study is to investigate CSS and other hemorheologic parameters in ACS and to evaluate the correlation with usual biomarkers for atherosclerosis such as fibrinogen, hs-CRP, and ESR.

## 2. Methods

Subjects presenting with typical angina who were scheduled coronary angiography. Patients were diagnosed with stable angina (SA), unstable angina (UA) and acute myocardial infarction (AMI) based on the clinical presentation, specific electrocardiogram (ECG) alterations and serum cardiac enzyme levels. 392 subjects were finally enrolled this study consisted of 169 SA, 153 UA and 70 AMI subjects.

## 3. Results

Compared to the stable angina group, laboratory results revealed elevated systemic inflammatory markers in ACS: (1) White blood cell counts (WBC) were 19.4% higher in AMI subjects ( $p < 0.001$ ); (2) hs-CRP values were 2.6-fold greater in the UA and 3.7-fold higher in the AMI group. So, WBV is much higher in ACS than SA.

CSS, in unit of mPa, was 25.7% higher in ACS ( $333.8 \pm 147.8$ ) than in SA ( $265.4 \pm 149.9$ ) ( $p < 0.001$ ).

Interestingly, CSS between UA and AMI were not significantly different. Mean value of ESR in patients groups were not significantly different, but showed increasing tendency having the rank order of AMI > UA > SA.

CSS was analyzed the correlation with all available clinical laboratory variables. CSS was highly correlated with inflammatory biomarkers, such as, WBC, hs-CRP, and the parameters related RBC aggregation, such as, fibrinogen, ESR

## 4. Discussion

The results of this study strongly support the hypothesis of a linkage between ACS and RBC aggregation indices, such as CSS, ESR, and low shear viscosity. And, those aggregation indices are strongly correlated with widely accepted risk factors for coronary artery disease, such as WBC, fibrinogen.

CSS which can be directly measured by the present transient, microfluidic aggregometer, were higher value in ACS than SA. CSS might provide the useful information on the characteristics of RBC aggregation-disaggregation and hemorheological risk for CAD. The CSS may be used in clinical field as an easily measurable novel risk marker for ACS.

## Acknowledgments

This work was partly supported by the R&D program of MKE/KEIT (KI001810030039), Republic of Korea.

## References

- 1) B. K. Lee, A. Durairaj, A. Mehra, R. Wenby, H. Meiselman and T. Alexy, Hemorheological abnormalities in stable angina and acute coronary syndromes, *Clin Hemorheol Microcirc* **39**, 43–45, 2008
- 2) B.K. Lee, J. Ko, H. Lim, J. Nam, and S. Shin, Investigation of critical shear stress with simultaneous measurement of electrical impedance, capacitance and light backscattering, *Clin Hemorheol Microcirc* **51**, 203–212, 2012

# VASCULAR MECHANOBIOLOGY: FLOW DETECTION AND CALCIUM SIGNALING IN ENDOTHELIAL CELLS

Kimiko Yamamoto\*, Joji Ando\*\*

\*Laboratory of System Physiology, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo [7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, JAPAN]

\*\*Laboratory of Biomedical Engineering, School of Medicine, Dokkyo Medical University [880 Kitakobayashi, Mibu, Tochigi 321-0293, JAPAN]

## 1. Introduction

Vascular endothelial cells (ECs) change their morphology, function and gene expression in response to shear stress generated by flowing blood, and although their responses play important roles not only in the homeostasis of the circulatory system but in blood-flow-dependent phenomena such as anigogenesis, aneurysm formation and atherosclerosis, how ECs recognize shear stress and transmit signals into the cell interior is poorly understood. Our previous studies demonstrated that ATP-mediated calcium signaling is crucial to shear stress mechanotransduction.<sup>1</sup> Shear stress evokes a rapid, dose-dependent increase in intracellular calcium concentration by causing an influx of extracellular calcium through ATP-operated P2X4 ion channels. P2X4 activation requires ATP, which is supplied in the form of endogenous ATP released by ECs. In addition, our study in P2X4-knockout mice revealed that the absence of the calcium signaling triggered by shear stress leads to a reduction in endothelial NO production and impairs vascular functions in vivo, such as control of blood pressure, flow-induced vasodilation, and flow-mediated vascular remodeling.<sup>2</sup> The mechanism of ATP release as an early response to shear stress, however, is still unknown. To analyze the dynamics of ATP release, we developed a novel chemiluminescence imaging method by using cell-surface attached firefly luciferase and a CCD camera.<sup>3</sup>

## 2. Methods

The biotin-luciferase protein produced using a genetic engineering method was attached to the biotinylated cell surface of cultured human pulmonary artery ECs with streptavidin. The cells were placed in a parallel-plate-type flow chamber, and the flow chamber was placed on the stage of an inverted microscope. The ATP-free PicaGene reagent was perfused at a constant flow rate through the chamber as a luciferase substrate solution. Luminescence emitted as a result of the ATP-triggered luciferase breakdown of luciferin was detected with a water-cooling electron multiplier CCD camera, and extracellular ATP levels at the cell surface were visualized by using the Aquacosmos software program. The same cells were subjected to  $\text{Ca}^{2+}$  imaging. Cells were loaded with the  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitive dye Fluo-4 and changes in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration under shear stress were monitored with a CCD camera.

## 3. Results and discussion

As soon as the cells were exposed to shear stress, ATP was released from the entire surface of the cell membrane, and the ATP signals were particularly strong at localized regions at the edge of the cell, thereby indicating the existence of two distinct

manners of ATP release, a diffuse manner and a highly concentrated, localized manner. The ATP concentration reached more than  $10\ \mu\text{M}$  in the localized ATP release, but it remained below  $1\ \mu\text{M}$  in the diffuse ATP release.

Immunostaining of cells with an antibody to caveolin-1, a marker protein for caveolae, revealed that the localized ATP release occurred at caveolin-1-rich regions of the cell membrane. Caveolin-1 knockdown with siRNA markedly suppressed the localized ATP release, indicating involvement of caveolae in localized ATP release.

$\text{Ca}^{2+}$  imaging combined with ATP imaging showed that shear stress evoked a rapid increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration and the subsequent  $\text{Ca}^{2+}$  wave that originated from the same site as the localized ATP release. Comparison between the start of localized ATP release and increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration showed that ATP release always preceded the  $\text{Ca}^{2+}$  increase. Treatment of cells with angiostatin, a known blocker of ATP release, almost completely abolished both the shear-stress-induced ATP release and  $\text{Ca}^{2+}$  increase. These results suggest that the localized release of ATP at caveolae triggers the increase in  $\text{Ca}^{2+}$  concentration by activating nearby purinoceptors.

## 4. Conclusions

The novel ATP imaging method allowed us to visualize ATP release at the cell surface in real time, and demonstrated that exposure of cells to shear stress causes the ATP to be released in two distinct ways: diffusely and in a highly localized pattern. This localized ATP release occurs in caveolin-1-rich regions of the membrane and ATP release at caveolae results in a rapid increase in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration at these specific locations and propagation of this signal throughout the cell in form of a  $\text{Ca}^{2+}$  wave. Clarification of the mechanisms of ATP release should lead to a better understanding of the mechanotransduction of shear stress.

## References

- 1) Ando J. and Yamamoto K.: Vascular Mechano-biology: Endothelial Cell Responses to Fluid Shear Stress. *Circ. J.* **73**, 1983-1992, 2009.
- 2) Yamamoto K., Sokabe T., Ando J. et al.: Impaired flow-dependent control of vascular tone and remodeling in P2X4-deficient mice. *Nat. Med.* **12**:133-137, 2006.
- 3) Yamamoto K., Furuya K., Ando J. et al.: Visualization of flow-induced ATP release and triggering of  $\text{Ca}^{2+}$  waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J. Cell Sci.* **124**, 3477-3483, 2011.



## しめ鯖づくりと体積相転移現象

川口美咲\*, 市川 寿\*\*

\*長崎大学水産学部

\*\*長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 [〒852-8521 長崎市文教町 1-14]

### 1. 緒言

しめ鯖は、酢と塩の相乗効果を利用して魚肉を締めて食感の形成を図り、同時に保存性を向上させる伝統的な魚肉加工食品である。先に我々は、魚肉を酢に浸けると著しい膨潤（体積，質量増加）が生じる事，塩の共存はそれを抑制する事を見出した<sup>1)</sup>。すでに酢じめと塩溶性タンパク質や酵素作用との関連等が報告されているが<sup>2)</sup>，新たに，しめ鯖製法と魚肉の体積相転移現象との関連性を指摘した<sup>1)</sup>。そこで，しめ鯖製造工程に沿って魚肉の体積と物性変化の検討を行い，酢じめが引起こされる要件を明らかにしたいと考えた。

### 2. 実験方法

マサバ (*Scomber japonicas*) 生鮮魚 (平均体長 33 cm, 平均体重 530 g) の剥皮フィレを，体軸に直交して 5 mm 厚に切断した魚肉片を得た。これを，蒸留水または 5～26% の NaCl 水溶液 100 ml に 24hr 浸漬し，続いて 4%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  溶液 100 ml に 24hr 浸漬し，浸漬過程で魚肉片の体積 (V)，質量 (W) および破断強度 (BS) の経時変化を測定した。体積は，レーザー変位計 (OMRON, ZX2-LD50L) で計測した厚みと投影面積の積とし，質量は，電子天秤 (SHIMADZU, AUV220) で精秤した。破断強度は，レオメーター (FUDOH, NRN-2010J-CW) を用いて，幅 1 cm に切断した魚肉片の厚み方向から定速 6 cm/min でワイヤブランジャーを押当て測定した。

### 3. 実験結果と考察

マサバ魚肉片（浸漬実験前体積  $V_0$ ，質量  $W_0$ ，破断強度  $BS_0$ ）を，蒸留水に浸漬後 4%  $\text{CH}_3\text{COOH}$  溶液に浸漬した結果，酢酸浸漬 3hr 後， $V/V_0$  比 1.86， $W/W_0$  比 1.75 となって大きく膨潤し， $BS/BS_0$  比は 0.57 となって軟化した。その後，魚肉は顕著に溶解し始める事がわかった。一方，NaCl 水溶液に浸漬後酢酸に浸漬した場合の経時変化は異なり，Fig. に 26% NaCl 水溶液に浸漬した結果を示したが，特に  $BS/BS_0$  比 (◆) は塩水浸漬中 2.5 まで上昇した上，酢酸浸漬後 3hr で 4.67 まで上昇し，それ以降は低下した。魚肉片をすり潰して測定した pH (▼) 並

びに塩分濃度 (▲) の変化 (Fig.) は，酢酸浸漬後，魚肉の pH が 4，塩分が 2% に低下するまで，やや収縮してしかも強度が高い状態，すなわち ‘酢じめ’ 状態が保たれる事を示していた。

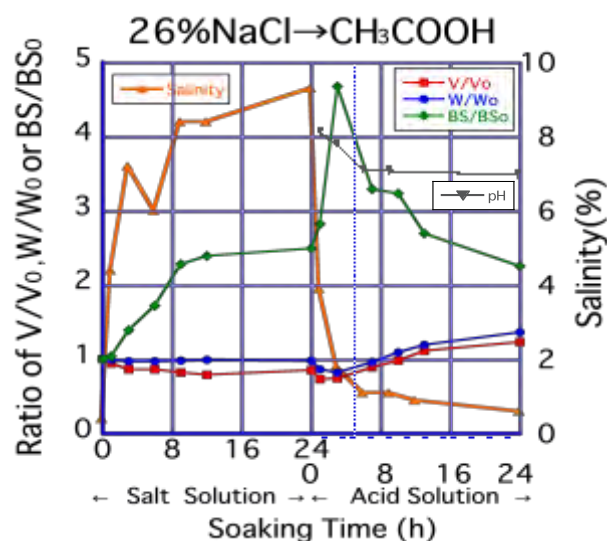


Fig. Changes of volume and breaking strength of chub mackerel meat in salt- and acid-solutions

この結果及びマサバ魚肉片を pH 2～9 の 0.1 M Na-Phosphate 緩衝液に浸漬した時の  $V/V_0$  比， $W/W_0$  比， $BS/BS_0$  比の検討結果，さらにその系に NaCl を加えた時の挙動から考察すると，魚肉の酢じめは，最初の塩水浸漬時に引起こされる「塩による浸透圧効果」と，酢酸浸漬時に起こる「酸性下で生じる体積相転移現象の塩による抑制」の相乗効果によって誘起される現象である事が示唆される。2つの物理現象，浸透圧変化，体積相転移と塩溶性タンパク質の溶解という化学現象<sup>2)</sup>を制御することで，魚肉の酢じめ具合が調節できると考えられる。

### 文 献

- 1) 市川寿，土橋敏明，近藤信吾：魚肉食品加工とバイオレオロジー，日本バイオレオロジー学会誌，19(2)，60-68，2005
- 2) 下村道子：酢漬け魚肉の調理，調理科学，19(4)，276-280，1986

## ゲル強度に優れた魚鱗由来熱水抽出ゼラチンのキャラクターゼーション

岡 智子\*, Wang Xi\*\*, 市川 寿\*\*, 関口拓磨\*\*\*, 近藤信吾\*\*\*, 槇靖幸\*\*\*, 土橋敏明\*\*\*

\*長崎大学水産学部

\*\*長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 [〒852-8521 長崎市文教町 1-14]

\*\*\*群馬大学大学院工学研究科 [〒376-8515 桐生市天神 1-5-1]

### 1. 緒言

海洋生物由来ゼラチンは、プロリンやヒドロキシプロリン含量が 1 割程低く、冷却時に形成されるゲルは低融点で、しかも高強度ゲルを得難いとされていた<sup>1)</sup>。しかし、我々は、適切な酸・アルカリ処理を施した後の魚鱗から、短時間の熱水抽出により市販の牛/豚由来食用ゼラチン同等以上の高強度ゲルを得る事が可能な事を報告した<sup>2)</sup>。この魚鱗由来ゼラチンについて、タンパク質化学的特性とレオロジー特性の検討を行った。

### 2. 実験方法

シログチ鱗から、前報<sup>2)</sup>に従ってゼラチン溶液を得た。80℃、30min の抽出で最も高いゲル形成能を示したことから、この溶液の紫外線吸収スペクトル及び凍結乾燥物の FT-IR 吸収スペクトルを測定した。また、タンパク質溶液を昇温・冷却した時の動的粘弾性とその周波数依存性を測定し、さらに、φ 2.5 cm の円筒形ガラス容器に高さ 2 cm 注ぎ、5℃で 24hr 冷却して得たゲルの破断強度を計測した。また、得られたゼラチンのタンパク質組成を SDS-PAGE 像のデンストメトリーにより分析した。

### 3. 実験結果と考察

シログチ鱗から得られたゼラチンは、115 kDa の  $\alpha_1$ -鎖を 26%, 110 kDa の  $\alpha_2$ -鎖を 7%, 190 kDa の  $\beta$ -鎖を 35% 含んだものが最も高いゲル破断強度  $3.80 \times 10^4 \text{ N/m}^2$  を示した。この溶液の UV-スペク

トルは 237 nm に強い吸収を示し、FT-IR スペクトル (Fig. 1) は  $1,659 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1,534 \text{ cm}^{-1}$ ,  $1,242 \text{ cm}^{-1}$  にそれぞれアミド I, II, III に帰属される吸収が確認されたことから、一般に知られるゼラチンの特徴を備えることが分かった。さらに  $2,949 \text{ cm}^{-1}$  にはアミド B に帰属すると思われる明瞭な吸収が観察され、コラーゲンでは認められるもののゼラチンで失われるとされる構造が保存されている事も示唆された。動的粘弾性の測定結果 (Fig. 2, タンパク質濃度;  $17.5 \text{ mg/ml}$ ) から、ゲル化温度は  $10.1^\circ\text{C}$ 、ゲルの融点は  $21.0^\circ\text{C}$  と求まり、また、 $5^\circ\text{C}$  で 2hr 冷却して形成されたゲルの  $G'$ ,  $G''$  は、それぞれ 270 Pa, 11 Pa であった。ゲル状態では周波数依存性が認められた。

なお、熱水抽出時間の経過と共にゲル形成能は低下したが、SDS-PAGE 像から求めた  $\alpha$ -鎖含量と  $\beta$ -鎖含量が特有の比の場合にゲル強度が高まる事が示唆された。

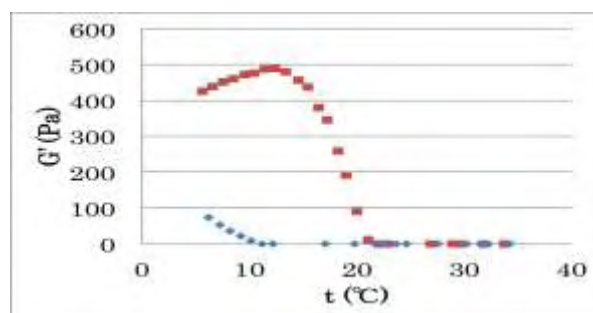


Fig.2 Rheological property of white croaker scale gelatin

Shere modulus  $G'$  were acquired in the order of cooling (◆) and heating (■) processes

### 文 献

- 1) 市川寿, 野崎征宜, 大迫一史: 藻場再生のための食害動物対策技術開発- 加工残滓からのコラーゲン抽出, 長崎県水産部, 74-83, 2005.
- 2) 為田, 岡智子, 市川寿: ゲル強度に優れた魚鱗由来熱水抽出ゼラチンの調製, 第 35 回日本バイオレオロジー学会, 日本バイオレオロジー学会誌, 26(2), 98, 2012.

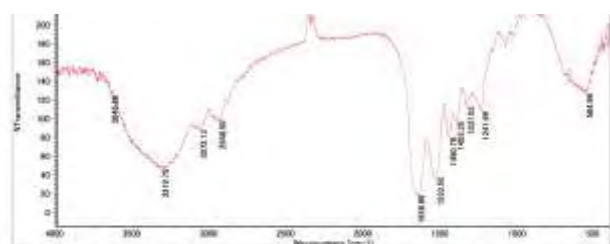


Fig.1 FTIR spectrum of white croaker scale gelatin obtained by heat-extraction

# スケトウダラすり身の低温ゲル化過程のレオロジー特性

金田 勇, 青沼航平, 舩津保浩

酪農学園大学 食と健康学類 [〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582]

## 1. 緒言

冷凍すり身は蒲鉾などの練り製品の間接原料である。練り製品の重要な食感である「足」はすり身のカット後低温で放置する「坐り」で向上することが知られている。しかしその低温ゲル化過程については不明な点が多く残されている。本研究では、スケトウダラすり身を用いて低温ゲル化過程のメカニズムの解明を目的とした。

## 2. 実験方法

解凍した冷凍スケトウダラすり身（SFA 級）をフードプロセッサでカットして測定サンプルとして供した。サンプルには3%の塩化ナトリウムおよび蒸留水を20%添加した。

坐り工程でのすり身のレオロジー特性変化：回転式レオメータ ARES を用いサンプル温度を 5, 10, 25, および 30℃に保持し 20 時間動的弾性率変化を記録した。

加熱ゲルの力学物性：すり身サンプルを 5, 10, 25, および 30℃で 20 時間保持した後に 80℃ 30 分間の加熱を行い加熱ゲルとした。これらのサンプルを圧縮試験機（Instron MINI55）を用いて一軸圧縮による力学物性評価を行った。測定はすべて室温で行った。

## 3. 実験結果

各温度での貯蔵弾性率の変化を Fig. 1 に示す。貯蔵弾性率の値は初期値で規格化した相対値 ( $G'_{rel}$ ) として示した。5 および 10℃で保持したサンプルはいずれも保持時間と共に上昇した。一方で 25 および 30℃で保持したサンプルは実験開始より 2 時間程度で急激に低下し、その後はほぼ一定の値となった。これらの結果よりスケトウダラすり身サンプルは

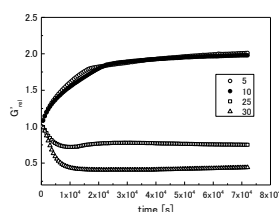


Fig. 1 Time development of the storage modulus for SURIMI at various temperature. The storage modulus is normalized by the initial values.

ことが明らかになった。

これら低温で保持されたすり身の加熱ゲルの力学特性の結果を示す。本研究ではすり身ゲルを円筒形に成型して一軸圧縮試験を行い、得られた応力-歪曲線を(1)式のような多項式で解析した。

$$\sigma = P_1\gamma + P_2\gamma^2 \cdots (1)$$

ここで $\sigma$ は応力、 $\gamma$ は歪である。一次の係数である  $P_1$  はヤング率に相当するパラメータであり、二次の係数である  $P_2$  は応力-歪曲線が歪硬化を呈する場合は正の値を、また歪軟化を呈する場合は負の値になり、その絶対値はそれぞれ歪硬化あるいは歪軟化の程度を表す。今回取得したデータはいずれも歪 0.01 を上回る領域で非線形になったため(1)式で解析し、 $P_1$ および $P_2$ の二つのパラメータを得た。解析結果を Fig. 2 および 3 に示す。

ヤング率に相当する  $P_1$  は 25℃以上での保持により大きな値になり“硬いゲル”になったことが見て取れるが、一方で  $P_2$  の値はいずれのサンプルも正の値でありこれらのサンプルが歪硬化を呈していることがわかる。絶対値は 10℃と 25℃では同程度あり 30℃ではむしろ低下した。

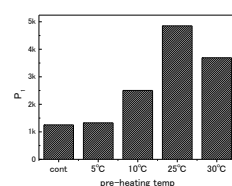


Fig. 2 The  $P_1$  values of heated gels which were kept at various temperatures.

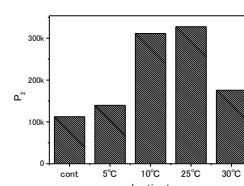


Fig. 3 The  $P_2$  values of heated gels which were kept at various temperatures.

## 4. 考察

所謂“坐り”を模した条件での低温処理によりすり身自体のレオロジー特性はその保持温度により極めて異なった応答をしめし、更にその後の高温加熱により形成されたゲルは低温加熱処理の履歴によりその力学物性が大きく変化することが確認できた。講演では SDS-PAGE によるそれぞれのステージにおけるタンパク質の変化挙動のデータも示しながら坐り工程がすり身ゲルの力学物性変化に及ぼす影響について考察する。

## 謝 辞

本研究は2012年度酪農学園大学共同研究の助成(採択No. 3)を受けたものである。

## コーンスターチゲルのレオロジー特性に及ぼす米粉添加の影響

○佐藤恵美子\*, 佐竹妙子\*

\* 新潟県立大学 人間生活学部健康栄養学科 [〒950-8680 新潟市東区海老ヶ瀬 471]

### 1. 緒言

米粉は、食料自給率向上、及び小麦粉に代わる食材として注目され、新潟県では米粉パン、麺等への需要が高まっているが、高齢者食への活用も米粉の普及拡大に繋がると考えられる。ブラマンジェとは白い食べ物という意味である。コーンスターチ（トウモロコシ澱粉）で調製するのが本来であるが、糊化温度が80℃程度の高温であるため、ゲル調製が難しく加熱中の水分蒸発も伴い硬いゲルになりやすい。そこで米粉を添加することによって、のどごしが良く飲み込みやすいブラマンジェの調製が可能となるのではないかと考えた。本研究では、コーンスターチ100%のゲル、米粉ゲル及びコーンスターチに米粉の添加割合を変えて、コーンスターチと米粉を各々50%ずつ同割合の混合ゲルを調製した。さらに、各種澱粉試料に対して、添加剤の種類として水及び牛乳添加ゲルの静的粘弾性、レオロジー特性について検討した。

### 2. 実験方法

供試コーンスターチ澱粉は、イオン株式会社製、(Amylose28%, Amylopectine72%, 平均粒子径8~10  $\mu$ m)、米粉は新形質低アミロース米(Amylose 10.5%, 新潟市斎藤製粉株式会社製「秋雲粉」平均粒子径17.7  $\mu$ m)を用いた。①澱粉の種類の影響では、コーンスターチ40g(以下コーン)、コーンスターチ20g・米粉20g(以下コーン・米粉)、米粉40g(以下米粉)に対して各々350gの水を加えて3種の試料とした。②添加剤の影響では、コーンスターチ40g、コーンスターチ20g・米粉20g、米粉40gの混合試料に対して、添加剤として水350g添加(以下水)、水175g・牛乳175gの同割合添加(以下水・牛乳)、牛乳350g添加(以下牛乳)の合計6種類を試料とした。試料を電熱器450W、攪拌速度250rpmにて20分間加熱

し、円筒型ガラスリング(直径20mm)に流し入れ上下をガラス板で密閉し、8℃、24時間保存し、測定温度は20℃に保持してレオナー(山電, RE-3305型)にて、力学測定を行った。

### 3. 実験結果及び考察

①米粉添加の影響：かたさ応力の結果から、コーンスターチに米粉を添加したゲルは軟らかくなり、凝集性は高い順にコーン、コーン・米粉、米粉となった。コーンスターチゲルの付着性は米粉を添加すると高くなった。クリープの瞬間弾性率  $E_0$  は、コーンスターチゲルの値が米粉添加50%ゲルに比べて高く、弾性率の大きい順にコーン、コーン・米粉、米粉となった。②添加剤の影響：牛乳添加によりかたさ応力や破断応力の値(1%の危険率)が高くなり、凝集性や付着性がやや増加した。クリープ測定では、コーンスターチ100%のゲルでは瞬間弾性率  $E_0$  の高い順に水、牛乳、水・牛乳となった。米粉添加ゲルは永久歪が大きいクリープ曲線になった。また、米粉50%の添加ゲルでは、瞬間弾性率の高い順に牛乳、水・牛乳、水となり、コーンのみのゲルとは添加剤の影響が異なった。ブラマンジェに米粉を添加すると弾性率が小さく軟らかくなり、凝集性や付着性がやや増して飲み込み易くなる。また米粉添加ゲルでも牛乳添加により、凝集性や付着性がやや大きくなることがわかった。

### 4. 結語

ブラマンジェには従来コーンスターチが用いられているが、本研究からも米粉添加はユニバーサルデザインフードの第4区分に相当し、高齢者食の開発に米粉の活用が期待される。

#### 謝辞

本報告の一部は第35回日本バイオレオロジー学会(新潟市)において、ポスター賞を受賞させていただいたことを改めて、お礼申し上げます。

## トマトゼリーの食味と物性に関する研究 —高齢者と若年者の比較—

○筒井和美<sup>1,2</sup>, 深川琴恵<sup>1</sup>, 田村朝子<sup>2</sup>, 荒井富佐子<sup>2</sup>, 宮西邦夫<sup>2</sup>, 佐藤恵美子<sup>2</sup>, 廣神里奈<sup>2</sup>, 早瀬和利<sup>1</sup>, 西成勝好<sup>3</sup>, 金巻栄作<sup>4</sup>, 二瓶英子<sup>5</sup>, 秋間美也子<sup>5</sup>

<sup>1</sup>愛知教育大学 [〒448-8542 愛知県刈谷市井ヶ谷町広沢 1]

<sup>2</sup>新潟県立大学, <sup>3</sup>湖北工業大学, <sup>4</sup>金巻屋, <sup>5</sup>有明ハイツ

### 1. 緒 言

これまで、国産トマトを用い、増粘多糖類の添加濃度が異なるトマトゼリーの食味と物性について研究を進めてきた<sup>1,2)</sup>。施設入所要介護の高齢者を対象に食味調査を実施し、口腔状態の違いによる食味評価を若年者と比較し、知見を得たので報告する。

### 2. 実験方法

#### (1) トマトゼリーの調製

国産トマト、製菓用混合増粘多糖類（ジェランガム、ローカストビーンガム、キサンタンガム等）、グラニュー糖などを加えて加熱し、トマトゼリーを調製した<sup>2)</sup>。その後、室温で 1 時間放冷し、冷蔵庫で 24 時間保管した。なお、グラニュー糖の添加濃度は 25%とした。

#### (2) 離水率の測定

ティーバック法<sup>3)</sup>より、ゼリー 50g に対する 20℃での離水量を経時的（1, 2, 4 時間後）に計量し、離水率を見積もった。

#### (3) テクスチャー測定

ユニバーサルデザインフード（以下、UDF と略す）の試験法に基づいて、ゼリーのテクスチャーを 20℃で測定した<sup>2)</sup>。なお、測定時の圧縮速度は 10mm/sec とした。

#### (4) 食味調査

(1) の増粘多糖類の添加量を変化させ、2 種類のゼリー（A; 添加濃度 0.32%, B; 添加濃度 0.65%）を用い、平成 24 年 8 月及び 12 月、高齢者 32 名、若年者 22 名を対象に、「甘さ」「かたさ」について 2 点比較法により食味調査を行った。同時に、被験者の咀嚼力を把握するため、歯数、義歯使用の有無などを調べた。なお、本調査は予め愛知教育大学 倫理委員会の承認を得て実施した。

### 3. 結果及び考察

#### (1) ゼリーの物理化学的特性

ゼリー A 及びゼリー B はいずれも、UDF の区分 3~4 の範囲内にあり、ゼリー A は、ゼリー B に比べて、最大応力と圧縮エネルギーが小さく、離水率は有意に大きかった ( $p<0.05$ )。特に、離水率は経時的に増加し、増粘多糖類の添加濃度と正の関係にあった。

#### (2) 食味調査

高齢者を自立 18 名と要支援及び要介護の 14 名の 2 群に分け、前者を「高齢者 I」（平均年齢  $75.4\pm 10.4$  歳）、後者を「高齢者 II」（ $86.8\pm 6.7$  歳）とした。高齢者 I・II は、若年者 ( $18.8\pm 1.1$  歳) に比べ、甘味とかたさの判定能力が低く、特に高齢者 II は高齢者 I に比べて順応効果が低かった。高齢者 II は、高齢者 I に比べて、アンケートに基づく咀嚼力に有意な差は認められなかったが、少ない歯数を補うため義歯を利用する者が多く、かたい食品を好む者が少なかったことが順応効果の低下の一因と考えられた。

### 4. 結 言

要介護度の高い高齢者は、食事中に義歯を使用するが、咀嚼力の低下等により、ゼリーの甘さやかたさに対する判定能力や順応能力が低かった。

### 謝 辞

食味調査に協力くださった皆様に感謝申し上げます。なお、本研究の一部は、平成 21~23 年度 新潟県立大学教育研究推進事業費の助成を受けて実施した。付記して謝意を表します。

### 文 献

- 1) 筒井和美ら：産学連携による菓子開発と地産地消の推進，人間生活学研究 3, 1-7 (2012)
- 2) 筒井和美ら：第 35 回日本バイオレオロジー学会年会プログラム・抄録集 35, 41 (2012)
- 3) Richard Ipsen et al.: Microstructure and viscosity of yoghurt with inulin added as a fat-replacer. Annual Transactions of the Nordic Rheology Society 9, 59-62 (2001)



# 単一赤血球変形能診断システム開発へ向けた

## 実験装置の試作とその動作検証

都築達也\*, 渡邊宣夫\*\*

\* 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 [〒337-8570 埼玉県さいたま市見沼区深作 307]

\*\* 芝浦工業大学 システム理工学部 生命科学科

### 1. 緒言

赤血球の形状変化する能力すなわち変形能は、糖尿病などの生活習慣病と関連することが示唆されるが、未だ信頼できる診断方法は確立されていない<sup>1)</sup>。そこで、我々は上記の診断方法へ応用可能な変形能評価方法の確立に向け活動している。

我々が着目した先行研究<sup>1)</sup>は周期的なせん断流れ変化時の血球形状モニタリング手法である。この手法は、平行板間の血液に対し片側板のみ往復運動させる機構を用いた。変形能評価方法としての可能性が示された一方で、個々の細胞を常にモニタリングが不可能であるため平均的評価により、ばらつきが大きいという課題が生じた。その課題を解決するための我々が提案する機構は、2枚の平行板のカウンターオシレーション機構 (Fig.1b 参照) である。この手法では、理論上、流れの隙間中央部にある赤血球は静止した状態で観察可能になる。そこで本研究は、上記のカウンターオシレーション機構を用いた単一赤血球変形能診断システム開発へ向けた実験装置を試作する事、加えてその妥当性を評価する事を目的とした。

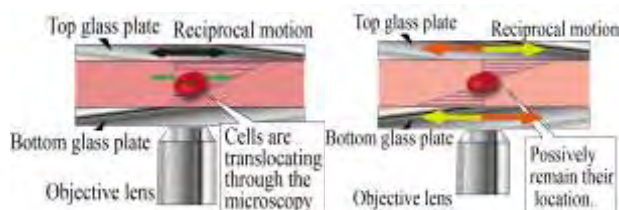


Fig.1a Previous study<sup>1)</sup>

Fig.1b Concept for single cell's shape monitoring

### 2. 実験方法

先行研究<sup>1)</sup>を参考に高粘度赤血球サスペンション溶液（粘度は血液のおよそ 200 倍）を準備した。試作した実験装置を用いて 2Hz の正弦振動流れを発生させ、隙間中央部にある赤血球を 40 倍の対物レンズを通して高速度カメラ (MEMRECAM GX-1, nac) にて撮影した。撮影条件は、フレームレート 500fps、露光時間 100 $\mu$ s/frame にて 139.2 $\mu$ m $\times$ 302.4 $\mu$ m の撮影領域に対し、464 pixels $\times$ 1008 pixels の画素数条件で実施した。

### 3. 実験結果

撮影画像から振動流れ環境下でいくつかの赤血球は、周期的な場所移動を伴いながらも変形流動挙動の一部

始終がモニタリング可能であることが認められた。比較的移動量の小さい 4 つの赤血球に対してモニタ上の移動軌跡を解析した結果が Fig.2 である。図上、y 軸は流れ方向、x 軸は流れに垂直方向を表す。この図から、流れ方向におよそ 70 $\mu$ m、流れに垂直方向におよそ 20 $\mu$ m の赤血球の場所移動が確認された。

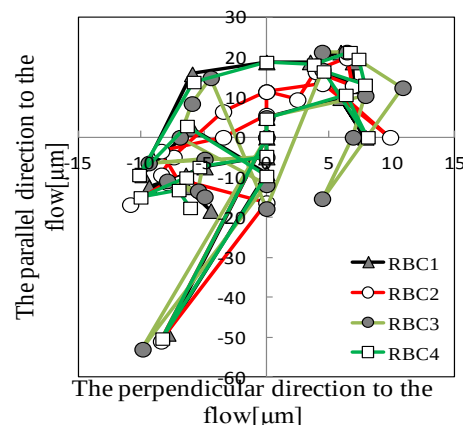


Fig.2 Displacement of individual RBC

### 4. 考察

撮影画像から、各赤血球は移動を伴いつつ、長軸は流れの向きに平行を保ったまま、周期的な形状変化を繰り返していた。赤血球の流れ方向への移動挙動 (Fig.2 の y 軸方向の移動) に関しては、対物レンズの被写界深度の幅の存在から想定内であったが、x 軸方向への移動挙動は想定外であった。流れに垂直方向へ移動した原因として、装置の動作時の機械的な遊びで流れに垂直方向へのガラス板の動きが発生した可能性がある。しかしながら、これらの移動量は、ガラス板の振動幅 2.5mm に対して流れ方向で 2.83%、垂直方向へ 0.71% であった事から、流れ場はある程度制御できた。

### 5. 結言

カウンタースリレーション機構を有するせん断流れ発生装置を試作しその動作を検証した。実験結果から、単一赤血球変形能評価手法として応用できる可能性が示唆された。

### 文 献

1) N. Watanabe et, al, 2006, *Biophys J*, 91 (5) :1984-98

# プリオンタンパク質におけるアミロイド性集合体を防止する作用機序の解明

佐伯政俊\*, 森井尚之\*\*, 橋本慎二\*

\* 山口東京理科大学 工学部応用化学科 [〒756-0884 山口県山陽小野田市大学通 1-1-1]

\*\*産業技術総合研究所 バイオメディカル研究部門

## 1. 緒言

アルツハイマー病や牛海綿状脳症などで見られるアミロイド性の自己集積体の形成機構とその防止法の解明は、病気の分子論的理解において不可欠である。我々は、これまでの研究において、タンパク質工学的発想と固相合成法による系統的な変異体有機合成からアミロイド集積体のアミノ酸残基レベルでの構造的法則性を明らかにし、プリオンのアミロイド集積構造の中核となる領域を導き出した[1-3]。本研究では、プリオンのアミロイド形成の中核の構造を基に、アミロイドの形成を防止するペプチドを設計し、そのメカニズムを検証することを目的とした。

## 2. 実験方法

プリオンのアミロイドを形成する核領域 (CRAP) の集積体形成を防止するために、CRAP のアミノ酸配列を基に、凝集に深く関わっているアミノ酸残基を親水性残基に置換したペプチド (BPAP-1) を設計した。また、BPAP-1 の配列の妥当性を評価するために、CRAP に認識すると想定されるアミノ酸残基の疎水性を弱めたペプチドを設計した。さらに、BPAP-1 において CRAP を強く認識しているアミノ酸残基を特定するために、CRAP と結合する側の疎水性残基を Gly に置換した一連のペプチドを Fmoc 固相合成法により合成した (図 1)。

| CRAP   | D | C | V | N | I | T | I | K | Q | H | T | V | T | T | T | K | G | E | N | F | T |
|--------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| BPAP-1 | V | N | I | N | I | K | D | a | T | V | N | T | N | T | T |   |   |   |   |   |   |
| NBP-1  | N | N | I | N | N | K | D | a | T | V | N | N | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| NBP-2  | V | N | N | N | I | K | D | a | T | N | N | T | N | N | N |   |   |   |   |   |   |
| NBP-3  | V | N | S | N | I | K | D | a | T | S | N | T | N | N | S |   |   |   |   |   |   |
| NBP-4  | V | N | I | N | I | K | D | a | V | T | T | N | T | N | N |   |   |   |   |   |   |
| GBP-1  | Q | N | I | N | I | K | D | a | T | V | N | T | N | T | Q |   |   |   |   |   |   |
| GBP-2  | V | N | Q | N | I | K | D | a | T | V | N | Q | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| GBP-3  | V | N | I | N | Q | K | D | a | T | Q | N | T | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| GBP-4  | Q | N | I | N | I | K | D | a | T | V | N | T | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| GBP-5  | V | N | Q | N | I | K | D | a | T | V | N | T | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| GBP-6  | V | N | I | N | Q | K | D | a | T | V | N | T | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| GBP-7  | V | N | I | N | I | K | D | a | T | Q | N | T | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| GBP-8  | V | N | I | N | I | K | D | a | T | V | N | Q | N | T |   |   |   |   |   |   |   |
| GBP-9  | V | N | I | N | I | K | D | a | T | V | N | T | N | Q |   |   |   |   |   |   |   |

図 1. アミロイドの形成を抑制する設計をした BPAP-1、および親水性残基に置換したペプチド NBP と Gly に置換したペプチド GBP のアミノ酸配列

CRAP の凝集抑制効果を調べるために、CRAP にモル比 1:1 で設計ペプチドを添加し、蛍光測定を行った。また、二次構造を調べるために円二色性スペクトル測定を行った。

## 3. 実験結果

CRAP に BPAP-1 を混合し、蛍光測定による凝集防止の評価を行ったところ、凝集の抑制効果が見られた。さらに、ペプチドの円二色性スペクトル測定では、BPAP-1 がアミロイドを形成しない二次構造として存在することを示した。一方で、凝集を防止しないように設計した NBP は凝集の抑制効果が見られなかった。また、GBP の蛍光測定による凝集防止の評価では、 $\beta$ シートの両端付近に位置するアミノ酸残基を置換した GBP-1、GBP-4、GBP-9 のペプチドは蛍光強度の増加が見られた。

## 4. 考察

BPAP-1 は、プリオンタンパク質のアミロイドの形成を抑制していると考えられる。BPAP-1 が凝集核に結合し、さらなる凝集を防止しているのに対し、NBP は凝集核へ結合しない設計のために凝集を防止しなかったことからアミノ酸配列の法則性に基づいた BPAP-1 の設計の妥当性を支持している。

また、Gly 置換したペプチドの結果から、ターン部位に近いアミノ酸残基は CRAP の認識が弱く、 $\beta$ シートの両端付近に位置するアミノ酸残基は認識が強い可能性がある。

## 5. 結言

構造モデルに基づいて設計したペプチド BPAP-1 は、特に $\beta$ シートの両端付近に位置する疎水性残基の相互作用により、CRAP に結合し、アミロイドの形成を抑制していることが示唆された。

## 文 献

- 1) Saiki, M., Honda, S., Kawasaki, K., Zhou, D., Kaito, A., Konakahara, T., and Morii H.: Higher-order Molecular Packing in Amyloid-like Fibrils Constructed with Linear Arrangements of Hydrophobic and Hydrogen-bonding Side-chains. *J. Mol. Biol.*, **348**, 983-998, 2005.
- 2) Saiki, M., Konakahara, T., and Morii H.: Interaction-based evaluation of the propensity for amyloid formation with cross- $\beta$  structure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **343**, 1262-1271, 2006.
- 3) Saiki, M., Hidaka, Y., Nara, M., and Morii H.: Stem-Forming Regions That Are Essential for the Amyloidogenesis of Prion Proteins. *Biochemistry*, **51**, 1566-1576, 2012.

# 光学顕微鏡による熱拡散現象の直接的観測法の開発

村田飛鶴\*, 喜多理王\*, 新屋敷直木\*, 八木原晋\*

\*東海大学大学院理学研究科 [〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1]

## 1. 緒言

分子の拡散現象のひとつであるルードヴィッヒ・ソレー効果(ソレー効果)と呼ばれる熱拡散現象に着目する。二成分からなる混合流体に対して安定的な温度勾配  $\nabla T$  を与えると溶質分子は低温側へ拡散し、見かけ上安定的な濃度勾配  $\nabla n$  が形成される。この時の溶質分子の流束  $J$  は

$$J = -D\nabla n - nD_T\nabla T \quad \dots(1)$$

で表される。ここで  $D$  は相互拡散係数、 $n$  は溶質分子の個数、 $D_T$  は熱物質拡散係数である。この現象は生体分子の機能と関連する事が示唆されているが、実測は困難である。本研究では、ソレー効果を定量的に測定・解析する為に温度勾配下においてブラウン運動する微粒子の直接観察を行なった。この為に顕微鏡のステージ上で温度勾配を形成する装置を試作し、詳細な解析を試みた。

## 2. 実験方法

サンプルは超純水で 5000 倍希釈したポリスチレンラテックス(粒子直径  $0.50\mu\text{m}$ )を用いた。サンプルセルは中央に厚さ  $0.6\text{mm}$ 、直径  $15\text{mm}$  の円形の枠が付いたスライドガラス(図 1)を用いた。2つのペルチェ素子を温度調節する事で液相に対し水平に温度勾配を付与させた。サンプルに付与した温度勾配は  $\nabla T = -0.20 \sim 0.19^\circ\text{C}/\text{mm}$  とした。その勾配下におけるポリスチレン微粒子のブラウン運動を光学顕微鏡およびカメラを用いて動画撮影し、軌跡を解析した。ここで、微粒子は 2 次元方向  $x, y$  に運動すると仮定した。

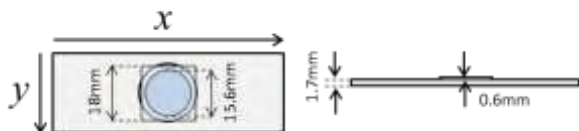


Fig.1. Schematic picture of the sample cell with a round frame, side view (left) and front view (right).

## 3. 実験結果および考察

ポリスチレン微粒子は一樣な温度においてはブラウン運動をしながらランダムな方向へ拡散したが、温度勾配下ではブラウン運動をしながら低温側へ拡散した。図 2 に温度勾配下における微粒子

の軌跡から得られた、任意の時間間隔での微粒子の  $x$  方向への移動距離とその頻度を示した。実線は微粒子の確率密度分布関数

$$f(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi D_x t}} \exp\left(-\frac{(x - \bar{x})^2}{2D_x t}\right) \quad \dots(2)$$

のフィッティングによって得られたものである。 $\bar{x}$  は移動距離の平均値、 $\sigma$  は標準偏差である。ポリスチレン微粒子はガウス分布の形状を保ったまま分布のピークは低温側へシフトした。また微粒子の  $x$  方向への相互拡散係数は温度勾配に依存しなかった。そして  $x$  方向への微粒子の平均並進速度は温度勾配に比例した。この結果から

$$J = v = -D_T \nabla T \quad \dots(3)$$

が得られ、これよりポリスチレン微粒子の熱物質拡散係数  $D_T$  を算出する事ができた。ここからソレー効果の特徴付けるパラメータであるソレー係数  $S_T$  が得られた。

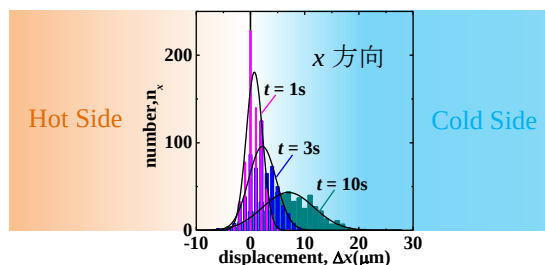


Fig.2 The frequency of the displacement of the microparticles to  $x$  direction when the temperature gradient is given to the  $x$  direction as  $\nabla T = -0.12^\circ\text{C}/\text{mm}$ .

## 5. 結言

今回試作した装置によって温度勾配を駆動力として低温側へ拡散する微粒子を可視化する事でソレー効果を定量的に測定・解析する事ができた。今後は得られた熱物質拡散係数の妥当性を検討していくとともに様々な実験条件における微粒子のブラウン運動を観測・解析していく。

## 文 献

- 1) 岸川友貴, 喜多理王: ソフトマテリアルの熱誘起分子拡散のレーザー計測, レーザー研究, **38**, 107, 2010.



# 小型 FALLING NEEDLE RHEOMETER を用いた血液の流動特性の解析

鈴木貴雅\*, 山本秀樹\*, 川村公人\*\*, Dominik Bernitzky\*\*\*, Roberto Plasenzotti\*\*\*

\* 関西大学大学院 環境都市工学部 [〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35]

\*\* アサヒグループホールディングス株式会社 [〒302-0106 茨城県守谷市緑 1-1-21]

\*\*\* Core Unit for Biomedical Research, Medical University of Vienna

[Wahringer Guertel 18-20 / AKH1Q, A-1090 Wien, Austria]

## 1. 緒言

血液の粘性率は血液流動解析において重要な基礎物性値の一つであるが、凝固特性等から測定は困難であり、実測例も限られているのが現状である。本研究ではこれまで、血液の流動特性(粘性率)を高精度で測定可能な小型落針式レオメーター(Falling Needle Rheometer, FNR)の開発を行ってきた。本研究では採血直後(3 分以内)のヒト血液の流動解析を行い、低剪断速度領域における血液粘性率について測定を行った。

## 2. 実験方法

実験装置の概略図を Fig.1 に、写真を Photo.1 に示す。装置は鉛直方向に設置された透明な二重円筒管構造となっており内径 8mm、高さ 90mm のセル内の流体中に金属(Fe,W)が封入された 8 本のニードル( $\phi 2 \times 20\text{mm}$ )を自由落下させ流動解析を行う。使用するニードルは低剪断速度域の解析用に密度調整を行っている。測定セルに導入される流体の体積は約  $4\text{cm}^3$  となっている。試料温度は、ペルチェ素子による温風を循環させ制御している。セル上部には機械制御によってニードルを自動落下させるため、ランチャー部と突き出し棒が一体となっている。セル下部にはニードルの落下速度を測定するためのセンサーが設置されている。

FNR は、終末速度で自由落下するニードル周辺の流体モデルを解析し、ニードル周辺の力のつりあい、ニードル周囲の微小円柱殻状の流体要素に働く力のつりあい、ニードル落下に伴い動く連続層側の流体量のつりあいをニードル表面速度と

内壁速度を境界条件として、被測定流体の構成方程式と連立させ解くことで、剪断応力( $\tau$ )と剪断速度( $\gamma$ )の関係を得た<sup>1) 2)</sup>。

## 3. 実験結果

ヒト血液の流動曲線を Fig.2 に示す。結果より解析によって得られたプロット群から、Casson 流体としての挙動を確認できた。剪断速度に対する見かけ粘度の関係を Fig.3 に示す。同一人物の血液を抗凝固剤の添加の有無で比較すると、高剪断速度における血液の見かけ粘度は 5.29 および 5.10 mPa·s となり抗凝固剤を添加しない血液の方がわずかに高い値となった。本装置で測定した抗凝固剤入り血液粘度は、Fig.3 に示す他の研究者が報告している回転式粘度計を用いた血液粘度と同程度の値を示した<sup>3) 5)</sup>。また、剪断速度が  $150\text{s}^{-1}$  以下における見かけ粘度は、剪断速度が小さくなるにつれて抗凝固剤を添加しない血液の方が高くなることを確認した。

## 4. 考察

低剪断速度領域における流動曲線上の非ニュートン流体挙動、見かけ粘度の上昇は、血液中の赤血球の凝集現象と密接な関係があると考えられる。血液は低剪断速度域では赤血球が凝集する特性を有しており、粘性が増加したと考えられる。

## 文献

- 1) H. Yamamoto et al., Int. J. Thermophysics, 31, 2361-2379, 2010.
- 2) H. Yamamoto, J. Chem. Eng. of Japan 25, 803, 1995.
- 3) Ditzel J., Dan. Med. Bull. 15, 49-53, 1968.
- 4) Litwin MS, Chapman K, Stoliar JB., Surgery 1970, 67, 2, 342-345, 1970.
- 5) H. Fujinaga, Jpn. J. Hyg., 39, 4, 1984.

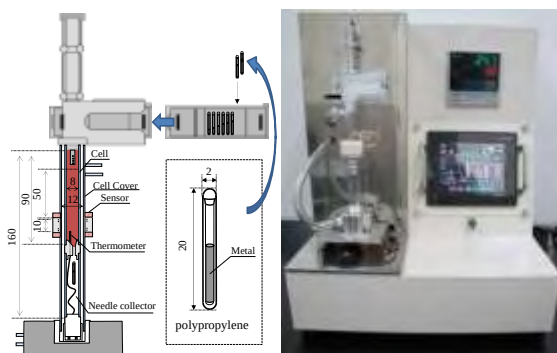


Fig. 1 Schematic diagram of experimental apparatus



Photo1. Photograph of the automatic falling needle rheometer

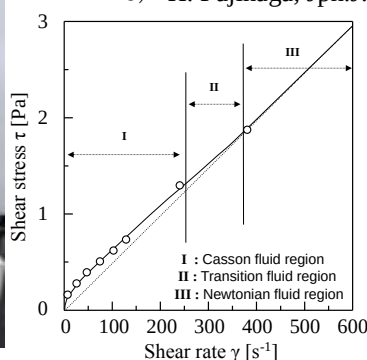


Fig. 2 Flow curve of fresh human blood for male without anticoagulant at 310.15 K

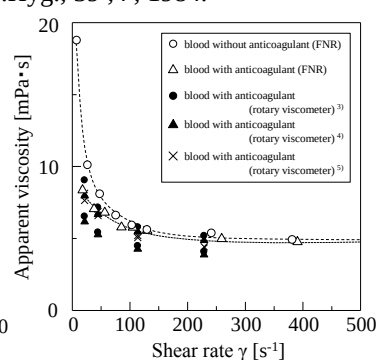


Fig. 3 Relationship between apparent viscosity and shear rate

## 温度勾配による 糖およびエチレングリコール水溶液の輸送現象

前田晃作\*, 篠原春香\*\*, 喜多理王\*, 新屋敷直木\*, 八木原晋\*

\*東海大学大学院総合理工学研究科 [〒259-1292 神奈川県平塚市北金目 4-1-1]

\*\*東海大学大学院理学研究科

### 1. 緒言

多成分混合流体に温度勾配を作用させると、濃度勾配を形成した状態で定常状態に至る。これは、濃度勾配を駆動力としたフィックの拡散と温度勾配を駆動力とした熱物質拡散のつり合いに起因する現象で、2成分系では流束  $J$  を用いて、

$$J = -\rho D \nabla c - \rho c(1-c) D_T \nabla T \quad (1)$$

で表される[1]。  $\rho$  は溶液の密度、  $D$  は拡散係数、  $c$  は溶質の重量分率、  $D_T$  は熱物質拡散係数、  $T$  は平均温度である。分子運動論的解釈では2成分のうち重い溶質成分が温度勾配の低温側へ、軽い溶媒成分が温度勾配の高温側へ拡散するが、糖、タンパク質、DNA等の水溶液で、逆の現象が確認されており、そのメカニズムは解明されていない[2,3]。また、作用させる温度勾配の大きさを変えての測定はその難しさから測定されてこなかったが、独自の改良を施したビームベンディング (BB) 装置を開発し、溶液に作用させる温度差を定量的に変化させた観測を行った。本研究では、様々な条件下での系統的測定を通じて、熱物質拡散の分子論的解釈を深める事を目的とする。

### 2. 実験方法

測定試料には、分子量や形状の異なる13種類の糖と、エチレングリコールオリゴマー (EG-6EG)、クラウンエーテル (12-crown-4、15-crown-5、18-crown-6)、グリセロール、非イオン性界面活性剤 ( $C_{12}E_5$ ) を用いた。溶媒には超純水 (milli-Q) を用いた。測定装置には試作した BB 法 (図1) と熱拡散型強制レイリー散乱 (TDFRS) 法[4]を用いた。

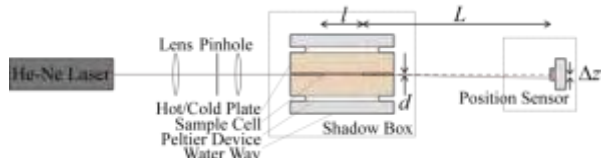


Figure 1. Side view of Beam Bending method. Laser pass  $l = 20$  mm, distance between sample and detector  $L = 180 - 450$  mm, and thickness of sample ( $\Delta T$ -direction)  $d = 1.5$  mm.

### 3. 結果と考察

図2 (a) は  $C_{12}E_5$  水溶液において BB 法で得られた測定結果の例である。縦軸はレーザー光の変位  $\Delta z$  が横

軸は温度差を作用させてからの経過時間  $t$  である。  $\Delta z$  は溶液の屈折率に比例し、0.02 時間付近と1時間付近で2段階の変位が見られた。それらはそれぞれ温度勾配の形成 ( $dn/dT$ ) と濃度勾配の形成 ( $dn/dc$ ) に起因する。濃度勾配に起因するシグナルの振幅から、形成される濃度差を計算した結果が図2 (b) の縦軸である。横軸には作用させた温度差を取った。測定温度範囲において作用させた温度差と形成された濃度差の間には比例関係

$$\Delta c = -c(1-c) \frac{D_T}{D} \Delta T \quad (2)$$

が成り立ち、各温度差において  $D$  と  $D_T$  を定量的に決定できる事が明らかとなった。発表では更に糖やエチレングリコールの結果を用いて濃度依存性、温度依存性、分子量依存性の結果を示す。糖[3]や様々な生体高分子[2]では共通の温度依存性を見せているが、エチレングリコールのような非生体分子には生体分子とは系統的な違いがある事が明らかになってきた。

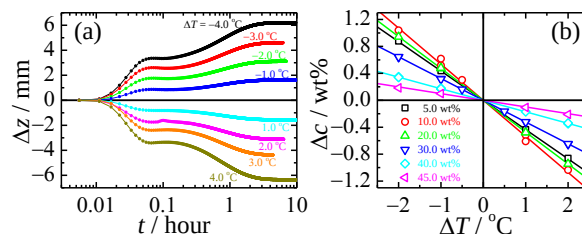


Figure 2. (a) Typical results of Beam Bending signals of 45.0 wt%  $C_{12}E_5$  aqueous solution at 23.5 °C for various temperature gradients. (b) The developed concentration difference as a function of temperature difference for various concentrations of  $C_{12}E_5$  aqueous solutions.

### 文 献

- 1) de Groot S. R. and Mazur P.: *Non-equilibrium Thermodynamics*, New York: Dover, 1984.
- 2) Kishikawa Y., Wiegand S., and Kita R.: Temperature Dependence of Soret Coefficient in Aqueous and Nonaqueous Solutions of Pullulan. *Biomacromolecules* **11**, 740-747, 2010.
- 3) Kishikawa Y., Shinohara H., Maeda K., Nakamura Y., Wiegand S., and Kita R.: Temperature dependence of thermal diffusion for aqueous solutions of monosaccharides, oligosaccharides, and polysaccharides. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 10147-10153, 2012.
- 4) Wiegand S.: Thermal diffusion in liquid mixtures and polymer solutions. *J. Physics-Condensed Matter* **16**, 357-379, 2004.

# 局所的に非一様な粒子群中の透過流動

大友 涼子\*, 原田 周作\*\*

\* 関西大学 システム理工学部 [〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35]

\*\* 北海道大学大学院 工学研究院

## 1. 緒言

透過流動は血液透析や人工臓器, イオン交換クロマトグラフィーなどでみられる重要な現象の一つである. こうしたプロセスでは, 濾過膜の形状やイオン交換担体の充填構造といった固相の形状と内部の流体の透過率との関係を理解することが不可欠となる. 本研究では, 局所的に非一様な構造をもつ粒子群中の透過率を理論計算によって算出し, 粒子のサイズ分布および空間分布が透過特性に与える影響について調べることを目的とする.

## 2. 計算方法

Stokes 流れ場を対象とし, Stokesian dynamics 法<sup>1)</sup>に基づき, 多粒子の存在による流体力学的効果を考慮した流動場解析を行う. 多重局展開によって得られた流体速度  $\mathbf{u}$  と粒子-流体間の相互作用力  $\mathbf{F}$  との関係は係数行列  $\mathbf{M}$  を用いて以下の式で表される.

$$\mathbf{u} = \mathbf{M} \cdot \mathbf{F} \quad (1)$$

本研究では, 多分散系に拡張した Ewald の格子和をとることにより係数行列  $\mathbf{M}$  に周期境界を適用し, 無限粒子層および一方に端部を有する有限粒子層を表した<sup>2,3)</sup>. 最終的に, Darcy の法則  $\mathbf{u} = (k \Delta P / \mu L) \mathbf{e}$  (ただし  $\mu$  は流体粘度,  $\Delta P / L$  は圧力勾配)と, 式(1)で表される流体速度  $\mathbf{u}$  と粒子-流体間の相互作用力  $\mathbf{F}$  との関係から透過率(permeability)を算出した.

## 3. 結果および考察

Fig.1に示す通り, 粒子の存在確率を重みづけする成層度  $\lambda$  というパラメータを設定し, 局所的に成層した粒子群を定量的に表現した. Fig.2 にさまざまな成層度における無次元 permeability  $k/a_0^2$  を示す. 成層構造( $\lambda \rightarrow 0$ )の permeability は一般的に, 各層における permeability  $k_i$  の逆数, つまり各層の透過抵抗の加算によって表される.

$$k = \left( \sum_{i=1}^c \frac{L_i}{L} \frac{1}{k_i} \right)^{-1} \quad (2)$$

ただし  $L$  は層全体の厚さ,  $L_i$  は各層の厚さである. 一方, ランダム構造( $\lambda \rightarrow \infty$ )の場合, permeability は粒子の面積平均径  $\langle a \rangle = \sum a_i^3 N_i / \sum a_i^2 N_i$  ( $N_i$  は半径  $a_i$  の粒子数)および粒子体積率の等しい単分散粒子群の permeability  $k_{\text{mono}}(\phi)$  によって近似的に表される<sup>4)</sup>.

$$k = k_{\text{mono}}(\phi) \frac{\langle a \rangle^2}{a_0^2} \quad (3)$$

Fig.2 より,  $\lambda$  の両極限における本計算結果はそれぞれ, 式(2)および式(3)の結果とおおよそ一致し, その

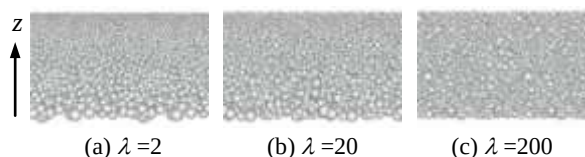


Fig.1 異なる成層度  $\lambda$  を有する粒子層 (粒子体積率  $\phi = 0.2$ ,  $\ln \sigma = 0.4$ ). 流体は  $z$  方向に透過する.

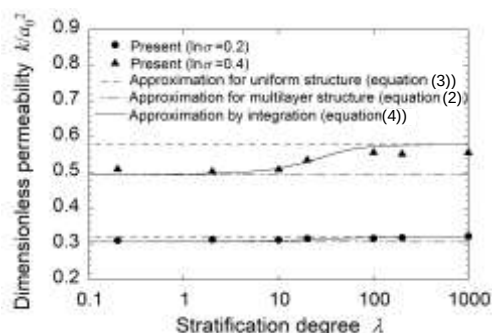


Fig.2 成層度  $\lambda$  と無次元 permeability  $k/a_0^2$  ( $\phi = 0.2$ ).  $a_0$  は代表粒子半径(ここでは 50% 粒子径の半径),  $\sigma$  は粒径分布の標準偏差であり, 分散性の大きさを表す.

中間では permeability は成層度  $\lambda$  に依存した値を示す. そこで式(2)で表される加算性を利用し, 微小領域  $dz$  における局所的な透過抵抗から permeability を次のように算出する.

$$k = \left( \int_0^L \frac{1}{L} \frac{1}{k(z)} dz \right)^{-1} = \left( \int_0^L \frac{1}{L} \frac{1}{k_{\text{mono}} \langle a(z) \rangle^2 / a_0^2} dz \right)^{-1} \quad (4)$$

ここで局所 permeability  $k(z)$  は, 微小領域  $dz$  における局所的な面積平均径  $\langle a(z) \rangle$  から, 式(3)の近似式を用いて算出した. Fig.2 から, 式(4)によって得られた近似解が本理論計算結果をおおよそ再現していることがわかり, 非一様な粒子群中の permeability が局所的な粒径分布に依存する局所透過抵抗の加算によって表されるというメカニズムが明らかとなった.

## 4. 結言

局所的に非一様な粒子群中の permeability が, 各位置における面積平均径に依存した局所透過抵抗の加算によって決定されるというメカニズムが明らかとなった.

## 文 献

- 1) Brady J. F., Phillips R. J., Lester J. C. and Bossis G.: J. Fluid Mech., **195**, 257-280, 1988.
- 2) Beenakker C. W. J.: J. Chem. Phys., **85**, 1581-1582, 1986.
- 3) Otomo R. and Harada S.: Transp. Porous Media, **96**, 439-456, 2012.
- 4) Sarkar S., van der Hoef M. A. and Kuipers J. M. A.: Chem. Eng. Sci., **64**, 2683-2691, 2009.



## 摩擦負荷培養法による再生軟骨組織形成とその力学特性に関する研究

福田圭祐\*, 澤江義則\*\*, 小俣誠二\*\*\*

\* 九州大学大学院工学府機械工学専攻

\*\*九州大学工学研究院機械工学部門

\*\*\*九州大学バイオメカニクス研究センター先進生体材料部門

### 1. 緒言

関節軟骨は、関節の骨表面を覆い、軟骨細胞と細胞自身から産生される細胞外基質 (ECM) と呼ばれる巨大分子構造で構成され、衝撃吸収や摩擦軽減などの重要な役割を担っている。しかし、自己再生能力に乏しく、自己治療は困難となっている。

現在、関節軟骨が損傷等した場合の治療法として、患者の細胞を用いる自家培養軟骨移植術が注目されている背景から軟骨細胞の培養の研究は進められており、培養中の再生軟骨組織に力学的負荷、特にせん断変形負荷を与えると II 型コラーゲンの産生が促されることが明らかにされている<sup>1)</sup>。しかしながら、軟骨組織特有の層状構造やプロテオグリカン (PRG) による最表層の形成などの構造的異方性を再現するまでに至っていない。

本研究では、培養中の再生軟骨組織に歩行時のような複雑な力学的負荷を組織に与えた場合の影響を知るために、ローラーを用いて再生軟骨組織表面に摩擦負荷を与え、その影響について調べた。

### 2. 実験方法

牛から採取した軟骨細胞をアガロースゲルに播種したものを再生軟骨組織モデルとし、Fig. 1 に示す摩擦負荷培養装置を用い、ローラーによる摩擦負荷を与えながら培養を行った。培養は摩擦負荷培養装置を用いて培養した摩擦負荷群と、同じ方法で作成し、摩擦負荷を与えずに培養した対照群を同時に行った。



Fig. 1 摩擦負荷培養装置

培養後の組織モデルに対し、ECM であるグリコサミノグリカン (GAG) および II 型コラーゲン含有量の比色定量を行うとともに、組織モデル断面の蛍光観察による構造評価、レオメータを用いた組織モデルの粘弾性特性測定を行った。

### 3. 実験結果

培養後の軟骨組織モデルの表面の様子を Fig. 2 に示す。摩擦負荷群の表面にはローラーが接してできた摺動痕が存在した。

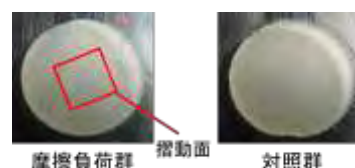


Fig. 2 培養後の再生軟骨組織モデル

定量の結果、GAG、II 型コラーゲン共に摩擦負荷群の方が対照群よりも含有量が高くなった。

また、蛍光観察の結果、摩擦負荷群では、表面付近の II 型コラーゲン密度が高くなるなど、ECM の分布に違いが確認できた。

粘弾性特性を調べるために貯蔵弾性率、損失弾性率を計測したが、傾向は確認できなかった。

### 4. 考察

定量、蛍光画像観察から、摩擦負荷を与えると II 型コラーゲンの産生と分布に影響が現れ、構造的異方性となる可能性が示唆された。また、II 型コラーゲンの量、密度が増加したため、その線維網に存在する PRG も増加したからと考えられる。

### 5. 結言

牛の軟骨細胞をゲルに播種したものを再生軟骨組織モデルとし、表面に摩擦負荷を与えながら培養した結果、ECM の産生量、分布に影響が確認でき、再生軟骨組織モデルは生体関節軟骨組織の持つ特徴に似た構造を持つことが示唆された。

### 謝 辞

本研究は科研費 (233600076) の助成を受けたものである。

### 文 献

- 1) Waldman, S. D. et al., J. Orthopaedic Research, 21(2003), 590-596.

## Flow Diverter (FD)を留置した脳動脈瘤内の 血流シミュレーション

鈴木貴士\*, 高尾洋之\*\*, 石橋敏寛\*\*, 増田俊輔\*\*, 門倉翔\*, Ashraf Mohamed\*\*,  
錢逸\*\*\*, 山本誠\*\*\*\*, 村山雄一\*\*

\*東京理科大学大学院 工学研究科 機械工学専攻 [〒125-8585 東京都葛飾区新宿 6-3-1]

\*\*東京慈恵会医科大学 脳神経外科, \*\*\*マッコーリ大学 先進医療学科,

\*\*\*\*東京理科大学 工学部 機械工学科,

### 1. 緒言

近年、脳動脈瘤の起始部にステント(Flow Diverter : FD)を置くことで血液の流れを変え、動脈瘤内への流入量を妨げ、血栓化を促す治療法が海外で行われている(日本では厚労省未承認)。論文の報告で、FDの留置により、無事に血栓化する動脈瘤や、留置後に破裂してしまう症例などが存在する。どのように血流を変えれば最善の治療になるか、あるいは、どのようなFDが治療に最も効果的なのかがわかっていない。FDの留置による血流動態の変化を定量的に評価し、また、それによる破裂の危険性を調査することは、脳動脈瘤の治療に大きく貢献することになる。

本研究では、FDを使用した治療の判断、テーラーメイドFDの設計、および最適なFDの設計などを目的とし、数値流体力学(CFD: Computational Fluid Dynamics)による血流解析を行い、FDを留置することによる血流動態の変化を数値的に評価した。

### 2. 解析手法

UCLA (University of California, Los Angeles)においてFDである“PE: Pipeline Embolization Device” (Covidien)を使用して治療された患者1症例を解析対象とする。解析はFD留置前と留置後の両方に対して行い、比較する。DSAによって撮影された頭部の水平断面画像から医用画像処理ソフト“Real Intage” (Cybernet Systems)を用いて3Dデータを作成し、脳動脈系を抽出する。抽出したデータをSTL (Standard Triangulated Language)形式に変換し、汎用3D可視化ソフト“Amira” (Visualization Sciences Group)を用いてスレーシングを行う。血液はICAから流入し、他の血管から流出する。

**3・1 計算格子生成** 作成したモデル形状を使用して、“ANSYS ICEM CFD 13.0”により計算格子を作成する。格子は非構造格子で、壁面近傍にプリズムメッシュを、その他の領域にはテトラメッシュを配置する。要素数は、FDモデル、血管モデルそれぞれ約100万、2600万要素である。流入・流出境界で非物理的

な解になることを防ぐため、流入・流出境界には75mmの直管を接続する。

**3・2 流体解析** 流れ場を非圧縮性層流場と仮定する。作動流体は密度 $1,100 \text{ kg/m}^3$ 、粘性係数 $0.0036 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ のニュートン流体を仮定する。壁面は剛体壁を仮定し、滑りなし条件とする。流出境界は流出面の静圧を平均 $0 \text{ Pa}$ として固定する。重合固体として、FDの影響を与える。2拍動分の非定常解析を行い、タイムステップは $5.0 \times 10^{-4} \text{ s}$ 、流入境界にはICAにおける健康な成人の平均流量<sup>(1)</sup>を使用する。なお、初期条件には定常解析の解を用いる。ソルバーには汎用熱流体解析ソフト“ANSYS CFX 13.0”を用いる。

### 3. 結果・考察

FD留置前後の解析結果を比較すると、瘤内へ流入する流量が最大で約31%減少した。瘤内の平均流速は最大で55%減少した。また、瘤内圧の上昇が57%認められた。FDを留置することにより、瘤内への流れの抑制効果が十分得られなかったことに対し、瘤内から流出する流路が狭まり、その結果、瘤内、および上流側の血管の内圧が上昇してしまったと思われる。

### 4. 結言

実形状モデルを使用し、CFDによるFDを留置した際の血流動態変化の解析を実現した。この技術によってテーラーメイドFDの設計や、治療への貢献が期待できる。

### 文 献

- 1) Matthew, D. F., Noam, A., Sung, H., L., David, W. H., and David, A. S.: Characterization of Volumetric Flow Rate Waveforms in the Normal Internal Carotid and Vertebral Arteries. *Physiol. Meas.*, **22**, 477-488. 2005.

# 拍動流中にある弾性壁動脈瘤モデルの壁せん断応力の変動

○山口隆平\*, 氏家 弘\*\*

\* 芝浦工業大学 機械工学科 [〒135-8548 東京都江東区豊洲 3-7-5]

\*\*東京労災病院 脳神経外科

## 1. 緒言

脳前交通動脈 ACoA と前大脳動脈 MCA の分岐部に発生した動脈瘤に着目し、弾性壁からなる球形動脈瘤モデルを用いて流れパターンを検討した。本研究では、拍動流における弾性、および剛体の瘤壁に生じる壁せん断応力 WSS を比較し、弾性の影響を検討する。

## 2. 実験方法

実験に使用する弾性壁モデルを、Fig.1 に示す。ここでは剛体壁モデルは特に示さない。瘤部は直径  $D=12\text{ mm}$ 、ネック径  $N=6\text{ mm}$  とし、アスペクト比  $AR(=D/N)$  は 2.0 である。撮影は PIV を用い、トレーサ粒子は  $14\mu\text{m}$  の蛍光粒子を使用する。空間分解能は  $0.2\text{ mm}$  である。拍動流は平均レイノルズ数  $Re=435$ 、無次元振動数  $\alpha=4.0$ 、周期  $0.9\text{ s}$ 、無次元流量振幅  $A=0.68$ 、 $Re=Re_m(1+A\sin\omega t)$  で定義される正弦波状の拍動流とし、代表的な時刻  $\omega t=0, \pi/2, \pi, 3\pi/2$  で測定する。なお、瘤内の WSS はネック部の両端を e 点, o 点とし  $15^\circ$  間隔で測定し、主管となる MCA 上流の平均流量に相当するポアズイユ流れの WSS で除し無次元化する。

壁面から  $0.6\text{ mm}$  の位置の速度ベクトルの接線方向の速度勾配から直線近似で壁せん断応力 WSS を算出した。

## 3. 実験結果および考察

弾性壁瘤内の速度ベクトルの変化を、Fig.2 に示す。最大流量時  $\omega t=\pi/2$  に旋回流の速度は大きくなるが、時刻  $\omega t=\pi$  においてもその旋回流の速度は維持される。

弾性および剛体瘤壁に沿う一周りに渡る WSS

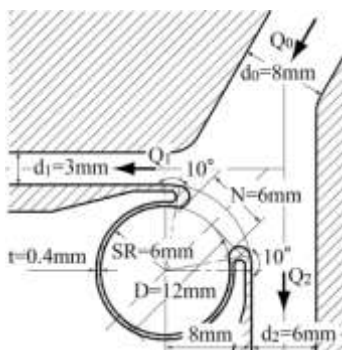


Fig.1 Sketch of elastic aneurysm model ( $AR=2.0$ )

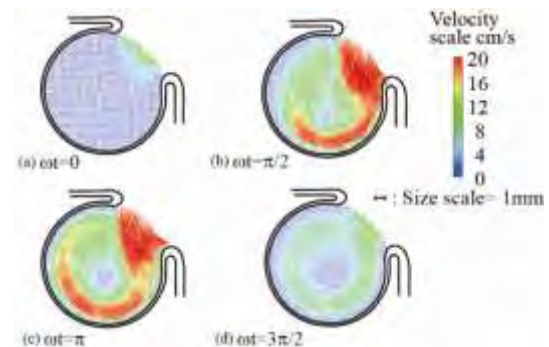


Fig.2 Velocity vector inside elastic model in pulsatile flow ( $Re_m=435, A=0.68, \alpha=4.0$ )

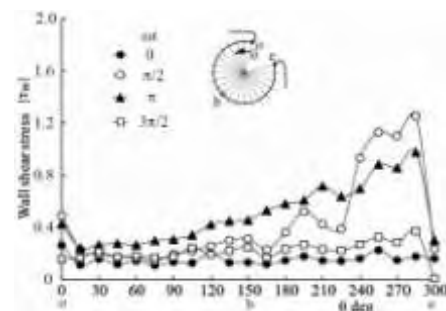


Fig.3 Distribution of wall shear stress inside elastic model in pulsatile flow ( $Re_m=435, Q_1/Q_0, \alpha=4.0, A=0.68$ )

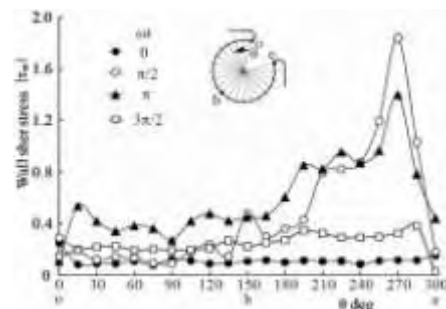


Fig.4 Distribution of wall shear stress inside rigid model in pulsatile flow ( $Re_m=435, Q_1/Q_0, \alpha=4.0, A=0.68$ )

の分布を、それぞれ Fig.3 および 4 に示す。瘤壁に沿う WSS の変化は弾性壁の方が小さく、その絶対値の平均値は 10% 程度小さい。

したがって、瘤壁の弾性は WSS を小さく、血栓等の発生を促し、瘤閉塞を誘引することを示唆している。

## 文 献

Okada K., & Yamaguchi R., Flow Structure Pulsatile Flow in a Model of Elastic Cerebral Aneurysm, J Biorheology, 25(2011), pp.1-7.

## 脳動脈瘤内の血流に及ぼすステントの影響

増田俊輔<sup>1),5)</sup>, 高尾洋之<sup>1)</sup>, 鈴木貴士<sup>2)</sup>, 門倉 翔<sup>2)</sup>,  
モハメドアシュラフ<sup>1)</sup>, 銭 逸<sup>3)</sup>, 山本誠<sup>4)</sup>, 村山雄一<sup>1)</sup>

1) 東京慈恵会医科大学 脳神経外科 脳血管内治療部 [〒105-8461 東京都港区西新橋 3-25-8]

2) 東京理科大学大学院 工学研究科 機械工学専攻

3) マッコーリ大学 先進医療学科 4) 東京理科大学 工学部 機械工学科

5) サイバネットシステム株式会社 メカニカル CAE 事業部

### 1. 緒言

米国で認可されているフローダイバーターステントについて留置後の破裂が報告されており、これに関連して脳動脈瘤にステントを留置することで瘤内圧が上昇し、破裂の可能性を高めているとの報告がある<sup>1)</sup>。

昨今、ステントを留置した際の血流に関する研究が盛んになりつつあるが、血流に対するステントの影響のメカニズムは正確にはわかっていない。

本研究では、臨床データを基に作成した簡略化モデルを用いて非定常血流解析を行い、ステントのワイヤー密度と瘤内の血流動態の関係を検証することを目的とする。

### 2. 解析方法

内頸動脈を模した母血管形状を作成し、その好発部位にサイズの異なる動脈瘤を配置した 2 つの解析モデルを用意した。留置するステントは、ワイヤー密度の異なる 7 タイプを用意し、それぞれの解析モデルに留置した。血流は非圧縮性層流場と仮定し、拍動を考慮した非定常解析（2 拍動、1.8 sec）を行った。拍動は、流入面に対し時系列速度プロファイル<sup>2)</sup>（最大速度：0.68 m/s, 最低速度：0.28 m/s）を与え、流出面は静圧 0 Pa とした。また、流体物性は密度 1,100 kg/m<sup>3</sup>, 粘性係数 0.0036 Pa・s のニュートン流体とした。なお、使用した CFD ソルバーは ANSYS CFX である。

### 3. 解析結果

動脈瘤内の圧力は、瘤サイズが小さいモデルではワイヤー密度が高くなるに従って低下し、瘤サイズが大きいものでは、ワイヤー密度が高くなるに従って一旦上昇し、再び低下する傾向を示した。

母血管からステントを通過して瘤内へ流れ込む血流量の割合は、瘤サイズに関係なくワイヤー密度が高くなるに従って減少する傾向が見られた。

ネック面において瘤内へ血液が流れ込む領域面積の割合は、瘤サイズが小さいモデルではワイヤー密度の変化による大きな変化は見られないが、

瘤サイズが大きいモデルは、ワイヤー密度が比較的低い場合には大きな変化はなく、一定の密度を超えると急激に上昇する傾向を示した。

### 4. 考察

瘤サイズが小さいモデルでは、瘤に流れ込む血流量、ネック面の流入面積の割合は、ワイヤー密度によって大きく変化せず、血液が瘤へ流れ込む際にステントから受ける抵抗と瘤から母血管に戻る際に受ける抵抗のバランスの変化が小さいため、瘤内の圧力にも大きな変化は見られない。しかし瘤サイズが大きいモデルでは、ワイヤー密度が高くなるに従って、瘤に流れ込む血流量が減少し、一定のワイヤー密度まではネック面の流入面積の割合が変化しない。その結果、血液が母血管に戻る際にステントから受ける抵抗の方が大きくなり、瘤内の圧力が上昇したと推察される。また、更にワイヤー密度が高くなるとネック面の流入面積の割合が急激に大きくなるため、血液が母血管に戻る際にステントから受ける抵抗が再び低下し、瘤内の圧力も低下したと考えられる。

### 5. 結言

瘤へ流れ込む血流量は、動脈瘤のサイズによらずワイヤー密度が大きいほど少なくなるが、瘤内の圧力は動脈瘤の大きさによって傾向が異なり、瘤が大きい場合はワイヤー密度が高くなることで圧力が上昇する可能性がある。

### 文 献

- 1) J.R. Cebal., F. Mut., M. Raschi., E. Scrivano., R. Ceratto., P. Lylyk., C.M. Putman., "Aneurysm Rupture Following Treatment with Flow-Diverting Stents: Computational Hemodynamics Analysis of Treatment," AJNR Am J Neuroradiol 32:27-33., Jan 2011.
- 2) Matthew, D. F., Noam, A., Sung, H., L., David, W. H., and David, A. S.: Characterization of Volumetric Flow Rate Waveforms in the Normal Internal Carotid and Vertebral Arteries. Physiol. Meas., 22, 477-488. 2005.

## 血液凝固能および血小板凝集能からみた抗血栓性 コーティングの特性に関する研究

○水野敏秀, 山岡哲二, 築谷朋典, 武輪能明, 巽英介

国立循環器病研究センター研究所 [〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-6-8]

### 1. 緒言

血液接触面を有する循環器系人工臓器の開発において、器材表面の抗血栓性処理は、近年では必須の技術とされており、優れた抗血栓性処理技術は、かかる開発段階において重要な要素となっている。本研究は、抗血栓性コーティングについて、より有用な評価法を確立するために、現在、医療機器に使用されているヘパリンコーティングおよびポリマーコーティングを対象に、その抗血栓性特性を詳細に検討し、その抗血栓性機序を解明することを目的とした。

### 2. 実験方法

本評価では、現在、実際に医療機器に使用されている T-NCVC コーティング（東洋紡、大阪）および MPC コーティング（日油、東京）の 2 種の製品について、その抗血栓性特性について解析を行った。

1) トロンボエラストメトリー (TEM) 法による抗血液凝固特性解析

本研究では、血液凝固能測定装置として ROTEM® (Munich, Germany) を使用し、本装置専用の計測用カップおよびピンに検討対象の抗血栓性コーティングを施した試料を作成し、内因系クロット形成能 (INTEM) および外因系クロット形成能 (EXTEM) について計測を行った。本測定に使用する血液は、同一ボランティアから採取された 3.8% クエン酸加ヒト新鮮血液を使用した。計測項目は、血液凝固時間を示す Clotting Time (CT)、カップ壁に付着するクロットの最大抵抗性を示す MAX clot firmness (MCF) およびその最大値に至るまでの計測時間 (MCF-t) とし評価を行った。

2) 電氣的インピーダンス (MEA) 法による抗血小板凝集能特性評価

本評価では、Multiplate® (Munich, Germany) 専用プラスチックセルに評価対象となるコーティングを塗布したものを使用した。測定に使用する血液は、ヒルジン添加新鮮ヒト血液を使用した。次に、血小板活性化アゴニストとして Adenosine diphosphate (ADP)、アラキドン酸、コラーゲン、リストセチン、Thrombin receptor activating peptide-6 (TRAP) を添加し、測定を行った。本検討での血小板凝集能測定は 15 分間と

し、セル内に設置された電極に活性化血小板が付着することによって起こる電極間の電氣的インピーダンスの増加を経時的に測定し、その増加曲線より area under curve (AUC) 値を算出し、コーティング表面に対する血小板凝集能の指標として評価した。

### 3. 実験結果および考察

TEM 法による抗血液凝固特性解析では、CT について、両コーティング共に無処理カップと差異を認めなかった。一方で、試験カップ壁へのクロット付着性については、T-NCVC コーティングカップで、INTEM, EXTEM ともに約 80% 減少し、MPC コーティングカップでは、約 70% 減少していた。また、MEA 法では、T-NCVC コーティングで無処理セルと比較し、ADP 凝集能およびアラキドン酸系凝集能は、約 20% 減少し、コラーゲン、TRAP およびリストセチンによる凝集には変化が認められなかった。一方、MPC コーティングセルにおいては、ADP 凝集能は約 95%、リストセチン凝集が約 90%、コラーゲン凝集が約 60% および TRAP 凝集が約 70% 抑制していることが観察された。本実験の結果より、T-NCVC コーティングおよび MPC コーティングの抗血栓性効果は、血液凝固に対する抑制作用は少なく、形成されたクロットが速やかにコーティング表面より剥離することが主な効果であると考えられた。また、血小板凝集に対しては、T-NCVC コーティングでは、血小板凝集の二次凝集系を主に抑制していることに対し、MPC コーティングは、一次凝集系を顕著に抑制し、各コーティングのそれぞれ異なる血小板凝集抑制効果を有すると考えられた。

### 4. 結言

本法により、抗血栓性コーティングの特性を血液凝固および血小板凝集過程ごとに定量的に評価することが可能となった。

### 謝 辞

本研究を進めるにあたり、MPC コーティングのご提供、ご助言を頂きました東京大学・石原一彦教授・深澤今日子研究員に対し、ここに深く感謝の意を表します。



## 低侵襲体外循環を目指した低充填量回路の作製 —ラット体外循環モデルを用いた評価—

藤井豊<sup>1,4</sup>, 巽英介<sup>1</sup>, 白井幹康<sup>2</sup>, 武輪能明<sup>1</sup>, 妙中義之<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> 国立循環器病研究センター 人工臓器部 [〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]

<sup>2</sup> 国立循環器病研究センター 心臓生理機能部

<sup>3</sup> 国立循環器病研究センター 研究開発基盤センター

<sup>4</sup> 大阪大学大学院 医学系研究科

### 1. 緒言

体外循環は、心臓手術および急性期心肺補助時には欠かせない方法となっている。しかし、体外循環は、血液希釈や炎症など生体に様々な影響を及ぼすことが知られており、その多くは解明されておらず、さらなる研究が必要である。また、近年、世界中の研究施設において、大動物での実験の実施が徐々に困難になりつつあり、小動物体外循環モデルの構築が求められている。我々はこれまでに小動物用体外循環回路を作製し、ラット体外循環モデルを構築してきた<sup>1</sup>。今回、これまでの回路より低充填量である、世界最小クラスのラット用体外循環回路を作製した。本研究では、今回、作製した低充填量回路においても安定した体外循環が施行できることを確認し、体外循環中の血液希釈等の評価をすることを目的とした。

### 2. 実験方法

SD ラット (♂ 400-450 g) を用い、従来の体外循環システム (充填量 15 ml) を用い体外循環を導入した高充填量群、今回、低充填量を目指し、新しく製作した体外循環システム (充填量 7 ml) を用いた低充填量群、カニューレーションのみを施し、体外循環は導入しない SHAM 群に分けた。麻酔導入後、人工呼吸器に接続し、血圧モニター用カテーテルを大腿動脈に挿入した。送血管を左総頸動脈、脱血管を右外頸静脈から挿入し右房に留置した。体外循環は灌流 60-70ml/kg/min、直腸温 36°C、PaO<sub>2</sub> 300-400 mmHg、PaCO<sub>2</sub> 30-40 mmHg で維持した。この方法にて体外循環を導入・維持し、体外循環前、体外循環後 60 分、120 分で血液サンプルを採取し、3 群間で血球分析を行った。

本動物実験は国立循環器病研究センター動物実験実施規定に則って行った。

### 3. 実験結果

3 群とも動脈血圧、心拍数は安定した。体外循環中は、高充填量群で血液希釈率はおよそ 30%、Hb は 10 g/dl 前後、低充填量群で血液希釈率はおよそ 17%、Hb は 12 g/dl 前後で推移した。両群、無輸血での体外循環維持が可能であった。

### 4. 考察

希釈率などの観点から、今回の低充填量回路を用いた体外循環は、これまでの回路を用いた体外循環より低侵襲であると考えられる。今後、高充填量回路、低充填量回路の使用による体外循環中のさらなる評価に加え、体外循環離脱後の回復期の生体評価などを行っていく予定である。

### 5. 結言

世界最小クラスのラット用体外循環回路を作製した。今回、作製した回路においても安定した体外循環が施行できることを確認できた。

これまで構築してきた小動物体外循環モデルと組み合わせることで、体外循環が生体に及ぼす影響の機序解明、さらに、各種体外循環デバイスの開発・評価にも役立つと考えられる。

### 文 献

- 1) Yutaka Fujii, Mikiyasu Shirai, Shuji Inamori, et al. Insufflation of hydrogen gas restrains the inflammatory response of cardiopulmonary bypass in a rat model Artificial Organs, 2013, 37, 136-141.

## 空気圧駆動式人工心臓用小型駆動装置のための空気流量を利用した拍出流量モニタに関する実験的検討

大沼健太郎\*, 本間章彦\*\*, 住倉博仁\*, 築谷朋典\*, 武輪能明\*, 水野敏秀\*, 向林宏\*\*\*,  
小嶋孝一\*\*\*, 片野一夫\*\*, 妙中義之\*, 巽 英介\*

\* 国立循環器病研究センター研究所 [〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]

\*\* 東京電機大学

\*\*\* 株式会社イワキ

### 1. 緒言

本邦において、体内埋め込み式の補助人工心臓 (VAD) の臨床使用が開始されたが、心移植の適応外や小柄で埋め込みに適さない患者の移植待機や、急性心不全に対する短期使用として体外設置型空気圧駆動式の拍動ポンプである国循環 Nipro VAD は、いまだ広く使用されている。Nipro VAD の問題点として、駆動装置が大型で患者の行動を制限する点、流量表示機能を有していない点がある。これに対し、当施設にてポータブル型の Mobart NCVC が開発された。さらに、より携帯性に優れ長時間電池駆動可能な小型装着式空気圧駆動装置 (WPD) も開発中である<sup>1)</sup>。装置の小型化による行動範囲の拡大、患者管理や安全性の観点からポンプ血流量モニタの必要性は高まると思われる。既存の血液ポンプに手を加えることなく、携帯性を損なわずに駆動装置側から簡便にポンプ血流量を把握できれば有用である。本研究では、ポンプと WPD をつなぐドライブラインの空気流量を測定することで間接的にポンプ血流量を推定することを目的に、模擬循環試験にて基礎的な検討を行った。

### 2. 実験方法

圧力負荷をほぼ一定に設定可能なオーバーフロー型模擬循環回路によるポンプ駆動実験を行った。WPD は、シリンダピストンによる空圧発生機構を有しており、圧力センサにより駆動圧、近接センサによりピストンの上死点・下死点を計測した。ドライブライン空気流量は、低圧力損失、高速・高精度の熱式質量流量計により計測し、駆動圧と室温を用いて体積流量に変換した。また、駆出期・充満期は近接センサ信号により分離した。ポンプ流量は流入側・流出側をそれぞれ超音波流量計により計測した。循環流体は水道水とし、駆動条件は、前負荷 10 mmHg を一定とし SD 比 (1 拍動中の駆出期間) 40%、拍動数を 60, 70, 80, 90, 100 bpm、後負荷 80, 100, 120 mmHg とした。

### 3. 結果および考察

ドライブライン空気流量と、ポンプ自体の流入・流出量 (流入側・流出側で計測した流量の差から算

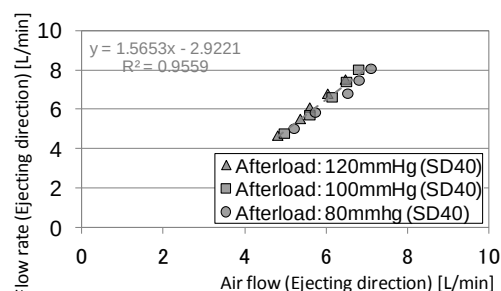


Fig. 1 Correlation between mean pump output and mean driveline airflow.

出) は、圧縮過程での位相差と駆出後期にとくにかい離があるが、波形の類似性が確認された。ポンプ機械弁の開閉にて生じる逆流成分、流入初期にダイアフラムの動きによらず慣性により流れている成分が認められた。これらは、空気流量に反映されないため誤差要因となると考えられた。駆出後期のかい離は、ポンプ空気室で駆動圧を開放しつつ体積を増すことでダイアフラムを押し出す際に生じる流れに起因すると考えられた。

流出側駆出期ポンプ流量に対する順方向空気流量の平均値について単回帰分析を行った結果、 $R^2=0.9559$  で高い直線性が認められた (Fig. 1)。傾きが 1 より大きくなった原因は、駆出後期のかい離が高流量域 (本実験において高拍動数、高駆動陽圧の領域) で大きかったためである。しかし十分な直線性が得られたことから、実験的に得られる弁の逆流量などを補正項とすることで十分実用的な推定値が得られると考えられた。

### 4. 結語

WPD を対象に、ドライブライン空気流量とポンプ流量を比較し、その類似性と誤差要因を確認した。また、平均流量で高い直線性が得られたことから、WPD の流量モニタとして本手法の有用性が示唆された。

### 文 献

- 1) Homma, A., Taenaka, Y., Tatsumi, E., et al. : Development of a compact wearable pneumatic drive unit for a ventricular assist device, J Artif Organs. 2008; 11(4): 182-90.

## 表面粗さを付加した回転せん断負荷装置内全体の血流解析

○西田正浩\*, 工藤大樹\*\*, 丸山修\*, 山根隆志\*\*\*, 松田健一\*\*, 増澤徹\*\*

\* 産業技術総合研究所 ヒューマンライフテクノロジー研究部門 [〒305-8564 茨城県つくば市並木 1-2-1]

\*\*茨城大学 工学部, \*\*\*神戸大学 大学院工学研究科

### 1. 緒言

表面粗さが溶血に与える影響を把握するために、血液に一定のせん断を負荷できる回転せん断負荷装置に表面粗さを付加したときの溶血量および流動状態を定量化している。溶血実験結果からは、表面粗さの大きさ  $R_a$  が  $1\ \mu\text{m}$  付近において、 $R_a$  が増加すると、溶血量の増加が認められた<sup>1)</sup>。しかしながら、表面粗さが溶血量を増大させるメカニズムは、未だ解明されていない。先の数値流体力学解析による研究では、回転せん断負荷装置の内筒への表面粗さの付加によっては、流速分布がほとんど変化せず、溶血量がせん断応力の 2.416 乗に比例するという Giesiepen ら<sup>2)</sup> の経験式を用いた推定溶血量の増加はわずかであった。その増加量は、閾値以上のせん断応力が溶血を引き起こすという仮定を用いると、数十%であった<sup>3)</sup>。ところが、内筒の角の丸み ( $R$ ) を考慮しなかったため、大きく見積もられた可能性があった。本研究では、回転せん断負荷装置の実形状を反映し、内筒の角の丸みを考慮したモデル内のせん断応力場を解析し、表面粗さと流動状態の関係ひいては溶血量との関係を定量的に調べた。

### 2. 解析方法

回転せん断負荷装置は、垂直軸を回転軸とした静止内筒と同心の回転外筒からなり、内筒と外筒の隙間に血液を充填することにより、血液にせん断応力を負荷する。内筒と外筒の隙間流れを、汎用の数値流体力学解析ソフトウェアを用いて解析した。解析モデルは、円筒部の隙間幅を  $0.45\ \text{mm}$ 、隙間半径位置を  $21.075\ \text{mm}$ 、内筒の円筒部から円錐部への角の丸みを  $0$  または  $0.1\ \text{mm}$  とした。内筒の円筒部に付加した表面粗さの幅を  $65\ \mu\text{m}$  とし、大きさ  $R_{\text{max}}$  を  $0, 0.5, 1, 2$  および  $5\ \mu\text{m}$  と変化させた。解析条件は、血液の比重を  $1,052\ \text{kg/m}^3$ 、粘度を  $3.5\ \text{cP}$  とし、回転外筒の回転数を  $600\ \text{rpm}$  とした。

### 3. 解析結果

Fig. 1 に表面粗さの大きさの最大せん断応力への影響を示す。表面粗さの大きさが大きくなるにつれて、最大せん断応力は増加した。その値は、内筒の角  $R$  が  $0$  のとき、 $205\ \text{Pa}$  から増加したが、 $R$  が  $0.1\ \text{mm}$  のとき、 $34\ \text{Pa}$  から直線的に増加した。

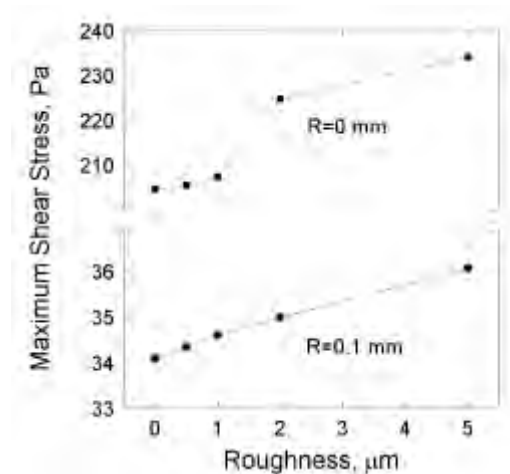


Fig. Maximum shear stress as a function of surface roughness

### 4. 考察

$R$  が  $0.1\ \text{mm}$  のとき、表面粗さの大きさが大きくなるにつれて、最大せん断応力は増加した。しかしながら、高せん断域は内筒の角付近にのみ限定されており、表面粗さを付加した円筒部全体において高せん断域が発生したわけではなかった。また、そのせん断応力の値も、Giesiepen らの経験式の条件範囲である  $57\ \text{Pa}$  以上という条件より低かった。よって、表面粗さの付加による推定溶血量の増減を示すには至らなかった。これより、溶血試験結果から表面粗さの付加により溶血量が増大するという結果に対する理由としては、1) 円筒部の角付近の高せん断域が支配的ではあるが、溶血を生じるせん断応力の閾値が  $35\ \text{Pa}$  付近に存在した、2) 連続体流れとしてではなく、固液混相流として影響を及ぼしたこと等が考えられた。

### 5. 結言

本回転せん断負荷装置による表面粗さの大きさの増加による高せん断域の増加は、内筒の角の影響が支配的であり、またその値も  $35\ \text{Pa}$  程度であり、その条件での溶血量の増加が表れる。

### 文 献

- 1) Maruyama, et al.: Artif. Organs, **30**, 365-370, 2006.
- 2) Giersiepen, et. al., Int. J. Artif. Organs, **13**, 300-306, 1990.
- 3) 西田他 4 名 : 機講論, 090-2, 269-270, 2009-8.

## 循環器系人工臓器の粘弾性学的血液適合性評価

○丸山 修\*, 可児裕基\*\*, 小阪 亮\*, 西田正浩\*, 山根隆志\*\*, 巽 英介\*\*\*, 妙中義之\*\*\*\*

\*産業技術総合研究所[〒305-8564 茨城県つくば市並木 1-2-1],

\*\*東京理科大学大学院理工学研究科[〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641],

\*\*\*神戸大学大学院工学研究科[〒657-8501 神戸市灘区六甲台町 1-1],

\*\*\*\*国立循環器病研究センター[〒565-8565 大阪府吹田市藤白台 5 丁目 7 番 1 号]

### 1. 緒言

人工心臓や体外循環ポンプなどの循環器系人工臓器に使用する血液ポンプは、ウィルヒョーの三原則に基づき、血流のせん断速度、血液凝固能、ポンプの表面材質の複合的要因によって、血液ポンプ内に血栓が生じ、合併症を引き起こすことが懸念される。血液ポンプを設計するにあたり、血栓形成に対してこれら三者の要因の関係を定量的に調べることで、血栓防止の有効な指標になると考えている。我々は、体内埋め込み型人工心臓に使用される血液ポンプについて、in vitro 抗血栓性試験による血液適合性評価法の確立を目指している。In vitro 抗血栓性試験では、上記三者の要因に基づいて血液ポンプ内に形成する血栓の有無を巨視的または微視的に観察している。そこで、本研究では、血液凝固能の指標として、活性化凝固時間 (ACT) を採用し、任意の ACT に設定した血液に対して、二重円筒式のレオメータを使用してせん断負荷を与え、ACT およびせん断速度に対する血栓形成量を定量的に求めることを目的とした。これにより、血流のせん断速度が生じる循環器系人工臓器における粘弾性学的血液適合性評価を行うことが可能となる。

### 2. 実験方法

本実験で使用したレオメータ (株式会社エルクエスト製レオロジー A300) は、血液接触材料が、ステンレス製の内筒およびガラス製の外筒からなる二重円筒式で、外筒が回転するしくみであった。クエン酸ナトリウムで抗凝固したウシ血液に塩化カルシウムで中和することで、ACT200~1,000s の試験血液を調製した。これらの試験血液に、100~2,880s<sup>-1</sup> のせん断速度を負荷し、血栓形成量を測定した。具体的には、内筒軸に設置しているトルクセンサーにより、血液凝固によって粘性が増加し、トルクの増加量から血栓形成量を血栓形成度として算出した。

### 3. 実験結果および考察

異なる ACT およびせん断速度に基づく血栓形成度のグラフを図 1 に示した。

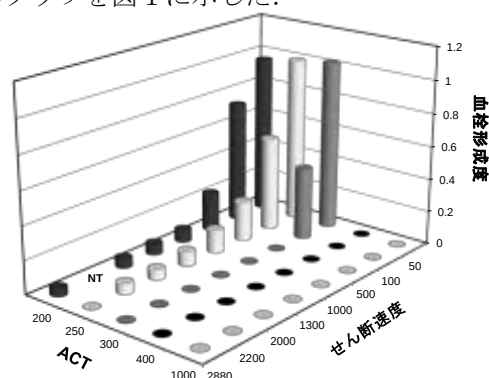


図 1 せん断速度と ACT に基づくウシ血液の血栓形成度

ACT400 秒および 1,000 秒の試験血液においては、せん断速度を 50s<sup>-1</sup> から 2,880s<sup>-1</sup> まで変化させても、血栓は形成しなかった。一方、ACT200 秒、250 秒、300 秒では、せん断速度の増加にともなって血栓形成度が抑制され、しかも ACT が高いほど抑制効果が高くなる結果が定量的に得られた。また、ACT200 秒では、せん断速度 2,880s<sup>-1</sup> においても血栓形成は抑制されるものの、完全に消失することではなく、従って、本実験条件では、せん断速度の増加だけで血栓を消失させることはできなかった。このことは、血液ポンプ設計の血栓抑制における指標として、せん断速度だけでなく、血液凝固能と併せて評価することが重要であることを示唆している。

### 5. 結言

血液接触材料がガラスとステンレスの場合において、せん断速度 50~2,880s<sup>-1</sup> および ACT200~300s に対する血栓形成量の関係を粘弾性学的手法により定量的に得た。

### 謝 辞

本研究は、NEDO 再委託「小柄患者用補助人工心臓の有効性および安全性の評価」により行われたものであり、謝意を表する。

## 自己組織心臓代用弁（バイオバルブ）の生体外機能評価

○住倉博仁\*, 中山泰秀\*\*, 大沼健太郎\*, 武輪能明\*, 巽 英介\*

\*国立循環器病研究センター研究所 人工臓器部 [〒565-5865 大阪府吹田市藤白台 5-7-1]

\*\*国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部

### 1. 緒言

我々は、人工物を体内に留置した際に起こる結合組織によるカプセル化反応を組織工学に応用し、皮下などの体内を組織構築の場（バイオリアクター）にして自己組織からなる移植片を作成する新しい生体内組織形成術（In body tissue architecture technology）を開発している<sup>1)</sup>。現在までに、汎用性高分子の一種であるシリコンの人工弁作製基材を鋳型として大動物（成ヤギ）皮下に埋入することで、循環系組織体としてバイオバルブと名付けた心臓弁の研究開発を推進してきた。本研究では、バイオバルブの弁機能に関し、拍動流回路を用いた生体外評価を行ったので報告する。

### 2. 実験方法

先行研究より開発してきた組立式の鋳型を成ヤギ（体重約 50 kg）の背部皮下に埋入した。約 2 ヶ月後に摘出し、内部の鋳型を除去して完全に結合組織のみからなるバイオバルブ（内径 16 mm）を得、冷凍保存した。作製したバイオバルブについて、拍動流回路<sup>2)</sup>を用いた生体外評価を行った。実験開始前に解凍したバイオバルブを拍動流回路の大動脈弁位置に接続し、生理食塩水を満たした 37℃の水槽内に沈めた。また、拍動流回路の作動流体も同様に生理食塩水を用いた。実験は、体循環系の圧力負荷に対するバイオバルブの特性に関し検討を行った。また、比較対象として市販機械式二葉弁、および生体弁を用いて同様の試験を行った。

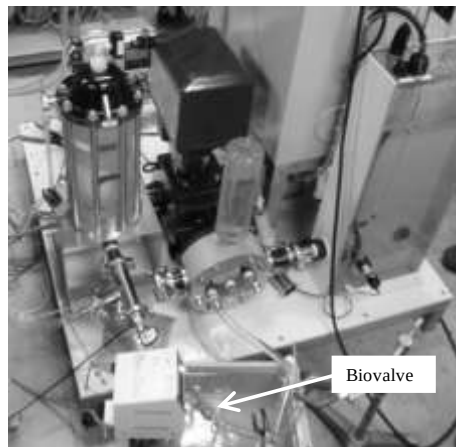


Fig. 1 Picture of pulsatile circulation circuit.

### 3. 実験結果、および考察

図 2 に特性試験の結果を示した。結果の一例として、拍動数 70 bpm、平均大動脈圧約 100 mm Hg、平均流量約 5 L/min における各人工弁の逆流率を示した。バイオバルブ、機械弁、および生体弁の逆流率はそれぞれ 3.1、3.4、2.7%であった。また、拍動数が増加した条件下においても、同様の傾向が確認された。体循環系の条件下において、バイオバルブは市販人工弁と同等の弁機能を有することが確認された。

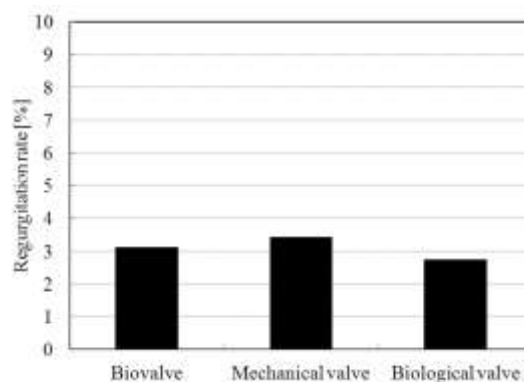


Fig. 2 Regurgitation rate of each valve  
(Heart rate = 70 bpm).

### 4. 結言

本研究では、完全に結合組織のみからなるバイオバルブを作製し、拍動流回路を用いた生体外機能評価を行った。その結果、バイオバルブは良好な弁機能を有しており、大動脈弁として機能することが確認された。

### 文 献

- 1) Yamanami M, Yahata Y, Uechi M, Fujiwara M, Ishibashi-Ueda H, Kanda K, Watanabe T, Tajikawa T, Ohba K, Yaku H, Nakayama Y.: Development of a completely autologous valved conduit with the sinus of Valsalva using in-body tissue architecture technology: a pilot study in pulmonary valve replacement in a beagle model, *Circulation* 2010;122(11 Suppl):S100-6.
- 2) Sumikura H, Homma A, Ohnuma K, Taenaka Y, Takewa Y, Mukaibayashi H, Katano K, Tatsumi E.: Development and evaluation of endurance test system for ventricular assist devices, *J Artif Organs* 2013 Feb 12. [Epub ahead of print]

## 浮遊攪拌培養法による ES 細胞の 未分化維持培養に関する検討

水本博，導寺香奈，網本直記，梶原稔尚

九州大学 大学院工学研究院 化学工学部門 [〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744]

### 1. 緒言

ES 細胞や iPS 細胞は、半無限の自己複製能と多分化能を有しており、再生医療における細胞ソースをはじめ、様々な分野での利用が多いに期待されている。一方、これらの多能性幹細胞を利用するためには、多分化能を有するいわゆる未分化状態での大量培養法の確立が必要である。本研究では、大量培養法として浮遊攪拌培養に着目した。そして、マウス ES 細胞を用い、種々の攪拌培養条件下における未分化 ES 細胞の増殖挙動の評価を行った。

### 2. 実験方法

単層培養にて維持培養中の未分化 ES 細胞 (Mouse, 129 Line) を酵素処理にて回収後、 $1 \times 10^4$  cells/ml の密度で未分化維持因子である LIF を添加した培地に懸濁した。この懸濁液 50ml を容量 50ml のスピナーフラスコに投入し、培養を行った。攪拌速度の検討として、40rpm, 100rpm, 120rpm, 140rpm, 170rpm, 250rpm の攪拌条件で培養を行い、攪拌速度が細胞増殖や未分化細胞が形成する凝集塊径に与える影響や培養環境 (pH 等) の推移について評価を行った。

また浮遊攪拌培養における継代プロセスの検討として、120rpm の攪拌培養条件下において継代を行った。1 代の培養期間は 3 日間とし、3 日毎に回収した凝集塊を酵素処理にて分散後、再度培養を行った。評価として、培養期間中の細胞数及び未分化細胞の推移について評価を行った。

### 3. 実験結果および考察

攪拌速度を変化させた際の各培養条件における細胞数変化を図 1 に示す。この結果、100～140rpm の攪拌速度では良好な対数増殖が示された。一方、40rpm では細胞数は経時的に減少し、また 170, 250rpm では細胞数の増加は示されなかった。これは、40rpm では ES 細胞を浮遊させるのに不十分であり、槽内の攪拌が十分でなかったこと、また 170rpm 以上の攪拌速度では、細胞に対する剪断応力の増加により、細胞が傷害を受けたことが原因であると考えている。

次に、120rpm の攪拌培養条件下において継代培養を行った際の細胞数変化を図 2 に示す。この結果、少なくとも 5 回の継代期間中の細胞の増殖挙動はほぼ同様の傾向を示した。この培養期間中において、未分化 ES 細胞が呈示する表面抗原である SSEA-1 を発現する陽性細胞の割合は 90～80% の間で推移した。また、未分化 ES 細胞の指標として用いられる Oct-4 の mRNA 発現レベルは、培養期間中ほぼ一定であることが示された。

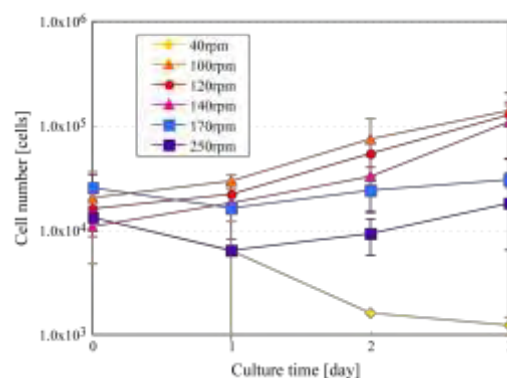


Fig. 1 Cell growth in various culture conditions.

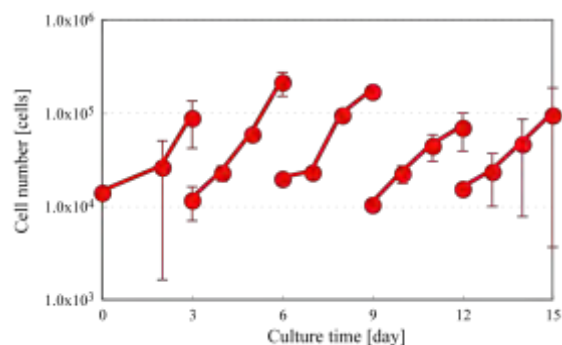


Fig. 2 Changes in cell number during serial passages in suspension culture.

### 4. 結言

攪拌培養条件を検討することにより、対数増殖を維持できる ES 細胞の浮遊培養条件を見出した。また継代培養中、ES 細胞は高い割合で未分化を維持できることが示された。以上より、本手法の大量培養プロセスへの展開の可能性が示された。

## POLY (VIVYL ALCOHOL) ハイドロゲルの変形特性と摩擦特性

中嶋和弘<sup>\*,\*\*</sup>, 鎗光清道<sup>\*,\*\*</sup>, 澤江義則<sup>\*,\*\*</sup>, 村上輝夫<sup>\*,\*\*</sup>

\* 九州大学 工学研究院 機械工学部門 [〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744]

\*\*九州大学 バイオメカニクス研究センター

### 1. 緒言

生体関節軟骨は長期に渡り優れた潤滑特性を持つ。この機能を模倣した新しい人工関節の開発を著者らは行っている。生体関節軟骨の潤滑特性は、コラーゲン線維強化組織の軟骨を母材として、プロテオグリカン凝集体が形成する表面ゲル膜による水和潤滑、表面に吸着した蛋白質や脂質の生体関節液成分による境界潤滑及び 80[mass%]程度の高含水組織による固液二相性潤滑効果によると考えられる。これらの潤滑効果を模倣することで、現在臨床応用されている人工関節よりも長寿命の新しい人工関節が実現出来ると考えられる。

生体関節軟骨は荷重負荷による変形だけではなく、液相の流出により摩擦特性が変化する。この挙動は生体関節軟骨の圧縮変形によるものと考えられ、その変形挙動が摩擦特性へ与える影響についての検討が必要である。

本研究では生体関節軟骨と人工関節候補材料である PVA(poly (vinyl alcohol)) ハイドロゲルについてその変形挙動と摩擦特性について検討した。

### 2. 実験方法

試験片として豚後肢関節より採取した生体関節軟骨、または PVA ハイドロゲルを上部楕円体試験片、スライドガラスを下部試験片として往復動摩擦試験を行った。PVA ハイドロゲルは重合度約 2000、ケン化度 98.5~99.4[mol%]の PVA 粉末より反復凍結・解凍法にて作製した。PVA ハイドロゲルの含水率は約 79[mass%]、弾性率は 1.2[MPa]である。摩擦試験は、滑り速度 10[mm/s]、ストローク 10[mm]、総滑り距離 144[m]、荷重 0.91[N]で行った。潤滑液には生理食塩水を用いた。滑り距離 36[m]毎に潤滑液中で 5[min]荷重を徐荷し、再水和・変形回復の時間を 3 回設けた。この再水和過程で生体関節軟骨表面の水和層の回復、および摩擦負荷により生体関節軟骨及び PVA ハイドロゲルより流出した液相の回復を期待した。

試験片のクリープ変形挙動特性を測定するために、接触面積変化を測定した。摩擦試験と同荷重、同時時間の接触時間を想定し、予荷重時間を 0[s] (摩擦開始直後)、3600[s] (36[m]摩擦負荷後)として測定した。

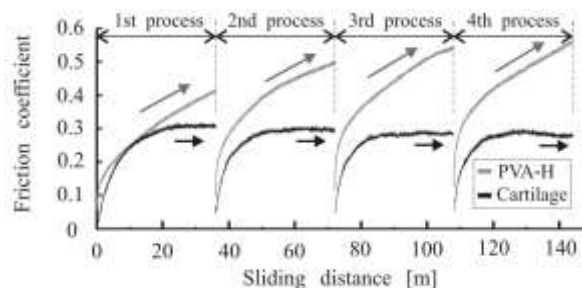


Fig.1 Transition of friction coefficient for natural cartilage and PVA hydrogel

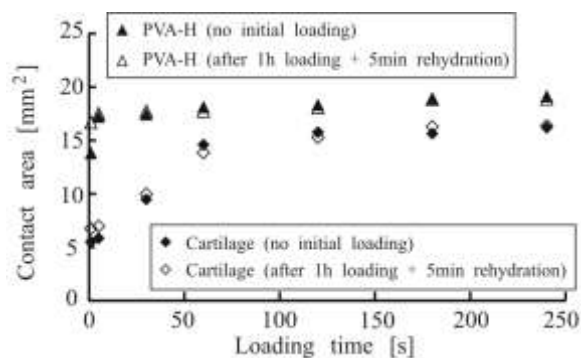


Fig.2 Time dependence of Contact area

### 3. 実験結果

Fig.1 に摩擦試験結果を示す。生体関節軟骨は摩擦開始直後の摩擦係数が PVA ハイドロゲルよりも低いことが観察された。また、PVA ハイドロゲルは滑り距離と共に摩擦係数が増加したが、生体関節軟骨は摩擦の上昇は抑えられていた。PVA ハイドロゲルでは摩擦開始と共に急激に摩擦係数が増加することが観察された。Fig.2 に接触面積の経時変化を示す。PVA ハイドロゲルでは荷重負荷 5 秒以内に急激な接触面積の増加がみられたが、生体関節軟骨では平衡状態まで 100[s]程度の時間が必要であった。生体関節軟骨の接触面積が平衡に達する時間は、摩擦が平衡状態へ達する時間よりもかなり短めであった。

### 4. 結言

生体関節軟骨と PVA ハイドロゲルの摩擦挙動と変形挙動について検討を行った。その結果、変形挙動と摩擦係数の推移には関連が見られた。薄膜潤滑下では、摩擦特性には固液二相性摩擦面の変形挙動が大きく影響するとともに表面摩擦の変化も影響する。



## 石灰化マルチチャネルコラーゲンをを用いた 多階層構造を持つ再生骨組織の構築

安井憲\*、古澤和也\*\*、福井彰雅\*\*、佐々木直樹\*\*

\*北海道大学 大学院 生命科学院

\*\*北海道大学 大学院 先端生命科学研究院 [北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目]

### 1. 緒言

生体組織は、複雑な階層構造を持っている。生体組織の階層構造は機能と密接に関係している。それゆえ、生体組織の持つ複雑な階層構造を模倣することは、再生医療分野において機能的な再生組織を構築するための重要な課題のひとつといえる。

我々はコラーゲン水溶液をリン酸緩衝液中に透析することでコラーゲン線維の配向構造やマルチチャネル構造を持つコラーゲングル（マルチチャネルコラーゲングル：MCCG）を調製する方法を確立した。MCCG は広い大きさの範囲で階層構造を持つため、生体組織の階層構造を再生するための細胞足場材料として利用することが可能である。我々は MCCG を骨芽細胞の細胞足場として利用することで、複雑な階層構造を持つ再生組織を構築することに成功している。

本研究では、さらに複雑な階層構造を持つ再生組織の構築方法を確立する。そのために、我々は MCCG を人工的に石灰化することで、多層石灰化領域を持つ石灰化 MCCG を構築する方法を確立した。発表では、石灰化 MCCG 上で骨芽細胞を培養することによって構築した再生骨組織の特性解析の結果について報告する。

### 2. 実験方法

実験には高研から購入したアテロコラーゲン水溶液（I-PC50）を用いた。200  $\mu$ l のコラーゲン水溶液を 100 mm ディッシュに滴下し、その上に直径 18mm の円形カバーガラスを置いた。次に、10 ml の pH7.10 のリン酸緩衝液をディッシュに注ぎ室温でフィルム状の MCCG を調製した。次にリン酸緩衝液を 40 mM CaCl<sub>2</sub> 水溶液に交換し 1 日静置することで MCCG の石灰化を行った。1 日後、CaCl<sub>2</sub> 水溶液をリン酸緩衝液に交換しさらに 1 日静置した。この操作を 8 日間交互に行うことで石灰化 MCCG を作製した。

作製した石灰化 MCCG 上にマウス由来骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1）を播種した。培養開始後 7 日間は増殖培地中で培養し、続く 21 日間骨分化培

地中で培養を行った。培地交換は 3 日に 1 回おこなった。一定期間培養を行った試料について、Alexa488-phalloidin とヨウ化プロピジウムで F-アクチンと核をそれぞれ染色し蛍光顕微鏡で観察した。

### 3. 結果と考察

Figure 1 に石灰化 MCCG の写真が示されている。今回の石灰化方法では MCCG の外周側と中心に二層の石灰化層が形成されており、さらにこの二つの層の間には非石灰化層があった。このような不均一な石灰化はリーゼガング現象によるものと考えられる。この試料について蛍光顕微鏡観察を行った結果が Figure 1(B)-(D)に示されている。MCCG の外周側石灰化層では、ゲル表面よりもゲル内部のマルチチャネル構造に優先的に細胞が浸潤している様子が観察された。MCCG の外周側石灰化層と中心部石灰化層の間の非石灰化層では細胞が均一に接着しているが、各層の境界付近ではさらに多くの細胞が接着していることがわかった。中心部石灰化層では細胞は均一に接着しており、他の領域と比較してもより多くの細胞の接着が見られた。これらの結果は、石灰化 MCCG の階層構造が細胞接着や構築される再生組織の構造に影響を及ぼすことを示唆している。

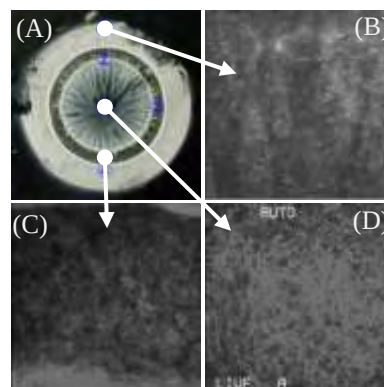


Figure 1 (A): Optical photograph of Calcified MCCG (CMCCG). (B)-(D): Fluorescence micrographs of MC3T3-E1-CMCCG composite.

### 第 3 日目

6 月 8 日(土)

## 低摩擦ハイドロゲルにおける応力-拡散結合

山口 哲生\*, 村上 輝夫\*\*

\* 九州大学大学院工学研究院機械工学部門 [〒819-0395 福岡市西区元岡 744]

\*\*九州大学バイオメカニクス研究センター

### 1. 緒言

ハイドロゲルを滑らせると、しばしば低摩擦を示す。ハイドロゲルの低摩擦メカニズムとして、①高分子鎖中の電荷に起因するゲルの膨潤および静的潤滑膜形成<sup>1)</sup>、②溶液に含まれるタンパク質や脂質の吸着による表面保護膜および弱せん断層形成<sup>2)</sup>、③固液 2 相性潤滑（応力 - 拡散結合）の効果による内部流体圧の発生や固体成分の荷重負荷能力の低減<sup>3),4)</sup>などが提案されているが、通常の摩擦では複数のメカニズムが同時に働くためメカニズムの検証は容易ではない。そこで本研究では、固液 2 相性潤滑の効果 (③) のみに着目し、人工軟骨材料として検討されている反復凍結 PVA ゲル（中性ハイドロゲル）を純水中で摩擦させる実験を行なった。

### 2. 実験方法

試料の調製：PVA ハイドロゲルは、15wt% PVA 水溶液に対し、反復凍結法<sup>5)</sup>を用いて作成した。ゲル化後 1 週間以上純水中で膨潤させた。摩擦実験：Figure 1 に実験装置の概略図を示した。ゲルをディスク上にカットした後、接着剤でレオメータ (Physica MCR 301, Anton Paar) の平行プレートに固定した。その後、平行プレートを一定の速度 ( $\Omega = 0.6$  rpm) で回転させ、垂直荷重およびスライドガラスとゲルとの摩擦トルクから摩擦係数を算出した。

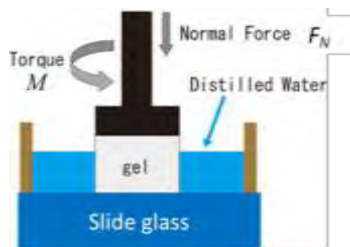


Figure 1: Schematic for frictional testing apparatus.

### 3. 実験結果

実験結果の典型例として、Figure 2 に様々な半径や厚みを持つゲルにおける摩擦係数の時間発展

を示した。Figure 2(a)では、試料の半径の違いによらず、共通した傾向が伺える：摩擦係数は約 0.08 からスタートし、時間とともに増大し、ある一定値 ( $\sim 0.13$ ) に漸近する。一方、半径によって摩擦係数増加の緩和時間は変化した。また、Figure 2(b)には、摩擦係数の試料厚み依存性を示した。ここから、試料を薄くするだけで摩擦係数が大きく低下することが分かる。ここで注意したいのは、この実験において、摩擦表面は一切変更していないということである。つまり、今回の結果は、ゲルの摩擦係数は表面の特性だけからは決まらず、試料の形状にも強く依存することを示唆している。

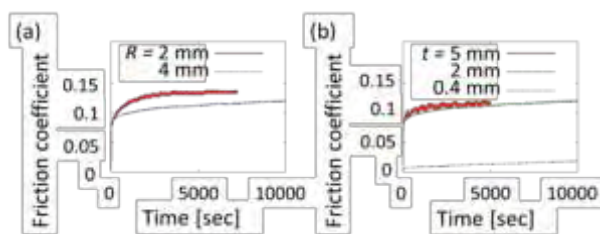


Figure 2: Time evolutions of friction coefficient for the gels with various (a) radii and (b) thickness.

### 5. 結言

本研究では、中性の PVA ゲルを純水中で摩擦させる実験を行なうことで、ハイドロゲルの特異な摩擦挙動を見ることができた。本発表では、現象を記述する理論もあわせて議論することによって、メカニズムや低摩擦ゲル創製について議論を行なう予定である。

### 文 献

- 1) J. P. Gong, *Soft Matter*, **2**, 544-552 (2006).
- 2) S. Yarimitsu, K. Nakashima, Y. Sawae, T. Murakami, *Tribol. Int.*, **42**, 1615-1623 (2009).
- 3) V. C. Mow, A. Ratcliffe, S. L.-Y. Woo, eds., "Biomechanics of Diarthrodial Joints", Vol. 1, Springer-Verlag (1990).
- 4) N. Sakai, Y. Hagihara, T. Furusawa, N. Hosoda, Y. Sawae, T. Murakami, *Trib. Int.*, **46**, 225-236 (2012).
- 5) T. Murakami, S. Yarimitsu, K. Nakashima, Y. Sawae, N. Sakai, T. Araki, A. Suzuki, *Proc. 6th International Biotribology Forum*, 65-68 (2011).

# リン脂質二分子膜リポソームの変形とリン脂質単分子膜の凝集状態

横尾麻衣, 黒田修未, ○成田貴行, 大石祐司

佐賀大学大学院 工学系研究科 循環物質化学講座 [〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1]

## 1. 緒言

リポソームは 2 分子膜内外の浸透圧差によって変形することが知られている。膜内外に浸透圧差を与える為には、イオン強度又は糖濃度をリポソーム内外で変える方法が一般的に用いられる。この操作は、膜内外の浸透圧差だけでなく、厳密には 2 分子膜を構成しているリン脂質の分子特性及び分子間相互作用に変化を与える。この分子の状態変化は膜内外の膜構成分子の集合状態や膜弾性の違いを与え、リポソームの変形にも何らかの影響を与えていると推察できる。本研究では 溶媒環境によって生じる膜状態変化がリポソームの変形に与える影響について検討することを目的として、膜の凝集作用が直接、形態に働くことができるユニラメラリポソーム (LUV) を使用して、いくつかの pH およびイオン強度における LUV の変形挙動について検討した。

## 2. 実験方法

$1.0 \times 10^{-4}$  M DOPC (dioleoylphosphatidylcholine) クロロホルム溶液に蛍光試料のペリレンを少量溶解し、ITO 基板に塗布した。この ITO 基板ともう一枚の ITO 基板でスペーサーを挟み、 $\pm 0.5$  V のパルス電圧をかけることで LUV を調製した。調製した LUV 分散液をシリカ基板状で乾燥し、AFM で観察した。緩衝液 MES (2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid) を①0.1 M, pH 4.5、②0.1 M, pH 7.5、③0.001 M, pH 4.5、④0.001 M, pH 7.5 の条件で調製し、各々の緩衝溶液にリポソームを浸し、形状変化を 90 分間光学顕微鏡下で CCD カメラにより撮影しリポソームの変形を確認した。

## 3. 実験結果及び考察

AFM 観察の結果、LUV とおぼしき形態の厚みが約 10 nm であった。DOPC 二分子膜の厚みは 4~5 nm であることから、結果から得た厚みは折りたたまれた DOPC 分子膜四層分の厚みにほぼ匹敵し、LUV が調製できたことを示している (図 1)。各緩衝液中での顕微観察の結果、緩衝液①0.1 M, pH 4.5 と②0.1 M, pH 7.5 に浸漬した際、LUV は初め楕円化し、その後小さな突起が生じて非球形へと変形した。また、LUV が小さい場合には、大きい LUV に比べ激しい突起がみられた (図 2(a)、及び (b))。③0.001 M, pH 4.5 と④0.001 M, pH 7.5 の際には LUV の大きな形状変化は確認できなかった (図 2(c))。①と②の場合、LUV 内外の

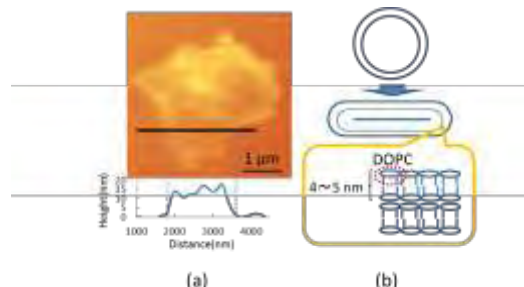


Figure 1(a) AFM image and cross-section profile of DOPC vesicle on mica substrate. (b) Schematics of the flattened DOPC unilamellar liposome and the expected structure of the folded and doubled membranes.

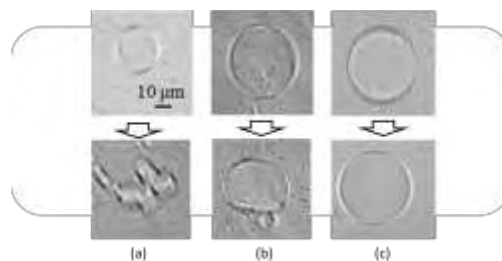


Figure 2 Deformation of DOPC vesicles after 30 min of exposure to MES buffers with (a) pH 7.5; ionic strength 0.1, (b) pH 7.5; ionic strength 0.001, and (c) pH 5.5; ionic strength 0.001.

イオン濃度の差から生じる浸透圧差により、水がリポソーム内側からリポソーム外側へと拡散し、形態が変形したと考えられる。LUV が小さい場合には体積に対して、水が出入りする表面積が広いので、速く水分子が LUV 外に拡散するため、激しく変形したと考えられる。③と④の緩衝液上の DOPC 単分子膜は、ベシクル内部の溶液条件上の DOPC 単分子膜に比べて凝集状態にあることが表面圧-表面積曲線からわかっている<sup>1)</sup>。膜の凝集状態に変化が生じる条件であっても LUV の形態変化が生じないことから、pH 変化に伴う膜凝集はリポソームの変形を誘起するに至らないことを示している。これは、膜曲げ弾性が膜の凝集圧に比べ、非常に大きいことと矛盾しない。

## 4. 結言

LUV 内側膜と外側膜の凝集状態および弾性特性の差は、リポソーム形態変形にほとんど影響を与えないことが明らかとなった。

## 文 献

- 1) Kuroda, O., Seto, H., Narita, T., Yamanaka, M., and Oishi, Y.: Liposome Deformation by Imbalance of pH and Ionic Strength Across the Membrane. *Progr. Colloid Polym. Sci.* **138**, 49–54, 2011.



## 醤油-アルギン酸ペーストの粘弾性挙動

松田 夏希\*,井上侑子\*,Saphwan Al-Assaf\*\*, 大石祐司\*, 成田貴行\*

\* 佐賀大学大学院 工学系研究科 循環物質化学講座 [〒840-8502 佐賀県佐賀市本庄町 1]

\*\* Glyndwr Univ. Phillips Hydrocolloids Research Centre

### 1. 緒言

昨今ジュレタイプの新形状醤油が登場している。このゾル状醤油は食感と見た目が特徴的である。醤油の中には多量の塩分が含まれており、またアミノ酸等の成分も多く含まれているため、その粘弾性挙動は複雑であるが興味深い。特に一般的に使用されている増粘剤は多糖類であり、塩を含むではその物性は大きく変わることが知られている。本研究では、塩分を多く含む醤油が、増粘剤である多糖水溶液の粘弾性挙動に与える影響を明らかにするため、増粘剤としてアルギン酸カリウム酸を用いて醤油-アルギン酸ペーストと食塩-アルギン酸ペーストの粘性挙動の比較を行った。実験に使用したアルギン酸カリウムにはグルロン酸 (G) もしくはマンヌロン酸 (M) を多く含む試料について検討することで、M/G 比の違いが粘弾性に与える影響についても検討した。

### 2. 実験方法

増粘剤としてグルロン酸を多く含むアルギン酸カリウム (K-1G) マンヌロン酸を多く含む (K-1M) 各アルギン酸カリウム水溶液 3 wt% に濃度が 0.25, 0.5, 1.5, 2, 2.5, 2.8 M になるように塩化ナトリウムを添加した試料と同程度の塩分を含む醤油-アルギン酸カリウム溶液を調製し、粘弾性挙動をレオメーターにて測定した。

### 3. 結果及び考察

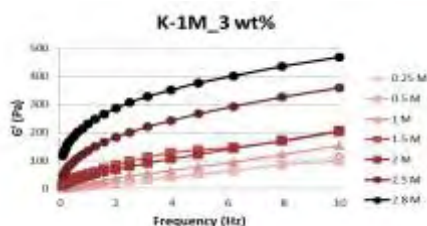


図 1. K-1M 3 wt% に NaCl を添加したときの  $G'$

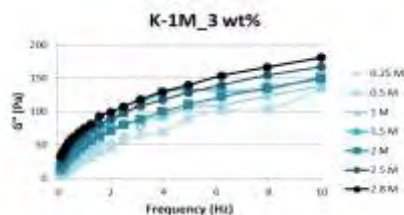


図 2. K-1M 3 wt% に NaCl を添加したときの  $G''$

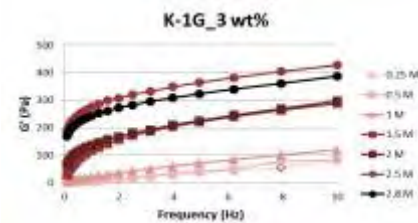


図 3. K-1G 3 wt% に NaCl を添加したときの  $G'$

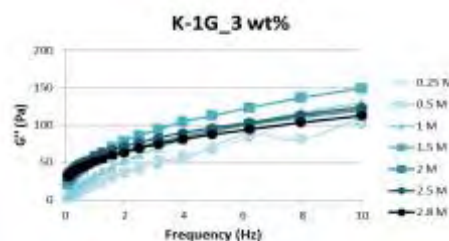


図 4. K-1G 3 wt% に NaCl を添加したときの  $G''$

K-1G 及び K-1M で調製した醤油-アルギン酸ペーストは塩化ナトリウムを添加量が大きくなるに従って  $G'$  および  $G''$  が増加した。若干 K-1G は K-1M に比べ低周波数領域で、塩の添加による  $G'$  変化が大きく現れた。一方で、 $G''$  においては周波依存性の違いが現れた。また、K-1G の場合、塩濃度が 2 M を超えると塩濃度増加に従い  $G'$ 、 $G''$  共に低下する傾向がみられた。

醤油-アルギン酸ペーストにおいては上記に示した食塩を添加した挙動とほとんど同じ傾向をしめた。この結果は、醤油に含まれるアミノ酸類は、増粘剤であるアルギン酸の粘弾性挙動にほとんど影響を与えないことを示唆している。

### 4. 結言

醤油がアルギン酸カリウム水溶液の粘弾性挙動に与える影響について検討した。塩化ナトリウムを添加した際と同様に、醤油添加によって、アルギン酸ペーストは増粘することから、ナトリウムイオンがカリウムと交換される作用によって、ゾル内である種の構造形成が生じ、結果  $G'$  及び  $G''$  の増加が観察されたと推察できる。

## ゼラチンゲルのレオロジーとヘリックス形成

榎 靖幸\*, 渡部 翔\*, 矢島一樹\*, 松尾光一\*\*

\* 群馬大学理工学研究院 [〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1]

\*\* 広島大学放射光科学研究センター

## 1. 緒言

ゼラチンゲルの物性は、温度変化の履歴に依存し、例えば、ゼラチン水溶液をゲル化点以下へ急冷後、ゲルの力学的性質は時間とともに非常にゆっくり変化することが知られている(エイジング)<sup>1)</sup>。ゼラチンは、トリプルヘリックス構造を持つコラーゲンの変性により得られるタンパク質であり、ゲル状態ではゼラチン分子が部分的にコラーゲン様のヘリックスを再生し架橋領域を形成していると考えられている。ゼラチンのエイジングの研究においては、旋光度測定によりヘリックス構造の再生が研究され、ゲルのレオロジー的性質との関係が議論されてきた<sup>2)</sup>。最近我々は、放射光源を用いた真空紫外円二色性(VUVCD)を用いて、ゼラチンゲルのエイジングにおけるヘリックス構造の再生過程を調べた<sup>3)</sup>。旋光度と違い VUVCD ではスペクトルの帰属を行うことにより、各構成成分の構造変化の寄与を明確にできる利点があり、糖などの光学活性のある添加物が共存する場合には特に有効である。

本研究では、ゼラチンゲルのエイジングにおける濃度や温度の効果を、VUVCD を用いたヘリックス形成過程とレオロジー的測定により調べた。

## 2. 実験方法

試料として、豚皮由来ゼラチン(新田ゼラチン APH-250, APH-150)を用いた。チオシアン酸カリウム水溶液を溶媒とする希薄溶液の静的光散乱測定<sup>4)</sup>により、これらの重量平均分子量は、 $2.6 \times 10^5$  (APH-250),  $1.3 \times 10^5$  (APH-150)と求められた。ゲルの調製には溶媒として Milli-Q 水を用いた。

動的粘弾性は、レオメータ (Rheologia A300, Elquest) を用い、歪み 1%、周波数 0.05–5 Hz で測定した。VUVCD スペクトルは、広島大学放射光科学研究センター(BL-15)において測定を行った。

## 3. 結果と考察

ゼラチンゲルの VUVCD スペクトルを測定し、コラーゲンのスペクトルと比較を行うことにより、波長 198 nm における楕円率  $\theta$  の値がゼラチンゲル中のヘリックス構造の量を反映していることがわ

かった。このことからゼラチンゲル中で再生されたヘリックス構造の割合(ヘリックス分率)  $\chi$  は、

$$\chi = (\theta - \theta_d) / (\theta_h - \theta_d)$$

で見積もることができる。ここで  $\theta_d$ ,  $\theta_h$  はそれぞれ、ランダムコイル状態のゼラチン水溶液と、コラーゲン溶液の楕円率である。

図 1 は、濃度  $c=3.0$  wt% および  $5.0$  wt% のゼラチンゲル (APH-150) の  $5.0^\circ\text{C}$  または  $9.0^\circ\text{C}$  でのエイジング過程における貯蔵弾性率  $G'$  をゼラチン濃度とヘリックス分率の積(ヘリックス濃度  $c\chi$ ) でプロットしたものである。以前の報告<sup>2)</sup>と同様に、ゼラチン濃度とエイジング温度によらず、一本のマスターカーブによって表現されることが示された。

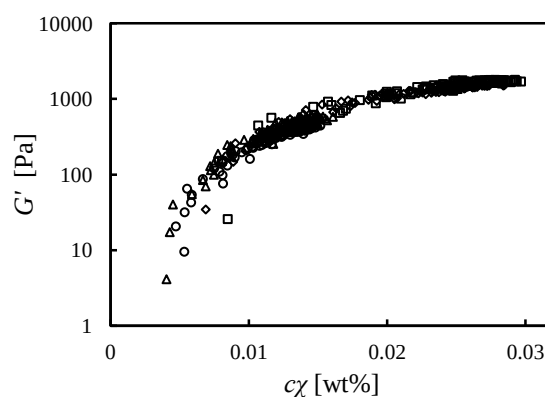


Fig. 1 Storage modulus  $G'$  of gelatin gels (APH-150) as a function of helix concentration  $c\chi$  for  $c = 3.0$  wt% at  $9.0^\circ\text{C}$  ( $\circ$ ) and  $5.0^\circ\text{C}$  ( $\triangle$ ) and for  $c = 5.0$  wt% at  $9.0^\circ\text{C}$  ( $\diamond$ ) and  $5.0^\circ\text{C}$  ( $\square$ ), respectively.

## 文 献

- 1) Parker, A., Normand, V.: Glassy dynamics of gelatin gels. *Soft Matter*, **6**, 4916-4919 (2010).
- 2) Joly-Duhamel, C., Hellio, D., Ajdari, A., Djabourov, M.: All gelatin networks: 2. The master curve for elasticity. *Langmuir*, **18**, 7158-7166 (2002).
- 3) 榎 靖幸, 渡部 翔, 松尾光一, 土橋敏明: 真空紫外円二色性を利用したゼラチンのエイジングの観察. *日本バイオレオロジー学会誌* **26**, 60 (2012).
- 4) Stejskal J., Straková D., Kratochvíl P.: Molecular characterization of gelatin by light scattering. *Makromol. Chem.*, **188**, 855-860 (1987).

## マルチチャネルコラーゲンゲルの 階層構造に与える温度の影響

古澤和也\*、花崎洋平\*\*、増元淳一\*\*、福井彰雅\*、佐々木直樹\*

\*北海道大学 大学院 先端生命科学研究院 [北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目]

\*\*北海道大学 大学院 生命科学院

### 1. 緒言

我々は酸性のコラーゲン水溶液を中性のリン酸緩衝液中に透析することで、コラーゲン線維の配向構造と巨視的なマルチチャネル構造を併せ持つコラーゲンゲル（マルチチャネルコラーゲンゲル：MCCG）を調製する方法を見出した<sup>1</sup>。MCCG は生体模倣的な階層構造をもつ。それゆえ、MCCG は生体組織の階層構造を再生するための鋳型として利用することが可能である。そのためには、MCCG の階層構造を調節することで、構築される再生組織の階層構造を制御する方法を確立することが必要不可欠である。

本研究では、MCCG を調製する際の温度を制御することでさまざまな階層構造の MCCG を調製する方法を紹介する。

### 2. 実験方法

実験には高研から購入したアテロコラーゲン水溶液（I-PC50）を用いた。200  $\mu$ l のコラーゲン水溶液を 100 mm ディッシュに滴下し、その上に直径 18mm の円形カバーガラスを置いた。次に、20 ml の pH7.10 のリン酸緩衝液をディッシュに注ぎ異なる温度（10  $^{\circ}$ C、20  $^{\circ}$ C および 30  $^{\circ}$ C）のインキュベーター内に静置することで MCCG を調製した。調製された MCCG のマルチチャネル構造を特徴付けるために ImageJ を用いて管径を測定した。また微視的な構造に与える影響を調べるために、小角光散乱測定を行った。

### 3. 結果

Figure 1 に異なる温度で調製した MCCG の写真を示した。放射状にマルチチャネル構造が配列していることがわかる。Figure 1 よりマルチチャネル構造の管径( $D_{\text{pore}}$ )は MCCG の縁からの距離( $r$ )の増加とともに太くなることがわかる。このことから、MCCG のマルチチャネル構造には管径勾配( $dD_{\text{pore}}/dr$ )があることが示される。異なる温度で調製した MCCG の管径勾配を比較した結果、調製温度の上昇とともに MCCG の管径勾配は有意に減少することがわかった。このことから調製温度に

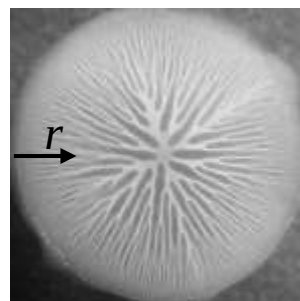


Figure 1. The optical photograph of the MCCG films fabricated at 10  $^{\circ}$ C.

よって管径勾配を制御することが可能であることが示された。

### 4. 考察

MCCG のマルチチャネル構造はコラーゲン水溶液の相分離によって形成されたマイクロ相分離構造がゲル化によってピン止めされることで形成される<sup>1</sup>。そのため、相分離が起こってからゲル化によってピン止めされるまでの時間 ( $t_p$ ) は、マルチチャネル構造の管径を決定する重要な因子となる。ゲル化の速度は温度上昇とともに速くなることが過去の研究により明らかにされている。それゆえ  $t_p$  は温度上昇とともに短くなる。 $t_p$  が短くなると、マイクロ相分離によって形成される希薄相のより大きく成長することができなくなる。このことが MCCG のマルチチャネル構造が温度によって変化するひとつの原因であると考えられる。

### 5. 結言

調製温度を変えることで、異なる管径勾配を持つ MCCG を調製することができた。この結果は、MCCG を用いて構築する再生組織の巨視的スケールでの構造制御に利用することが可能である。

### 6. 参考文献

- 1) Furusawa, K., Sato, S., Masumoto, J., Hanazaki, Y., Maki, Y., Dobashi, T., Yamamoto, T., Fukui, A., Sasaki, N., *Biomacromolecules*, 13, 29-39, 2012.



## DNA-陽イオン界面活性剤複合体フィルムの構造と物性

佐々木直樹○, E. C. Ossai\*, 岡田昂樹\*, 大木翔太\*, 古澤和也, 福井彰雅  
 北海道大学先端生命科学研究院, \*北海道大学大学院生命科学院  
 [〒060-0810 札幌市北区北 10 条西 8 丁目]

## 1. 緒言

高分子溶液から高分子固体への物性変化を引き起こす要因の一つに、高分子鎖の相互侵入による絡み合い形成がある。高分子固体の物性は、温度や分子量などを変化させること、他、絡み合いの量と質によって大きく変わってくる<sup>1)</sup>。温度や分子量は予め制御可能な量だが、従来の固体形成の方法では絡み合いに関するパラメータは、温度・分子量を決定すれば必然的に決まってしまう。もし、高分子の分子量を変化させることなく、固体中の絡み合い量を制御できるとすれば、より広範かつ絶妙な物性を持つ高分子固体を作ることができるのではないだろうか？このような問題意識から、我々は分子量を変えることなく、絡み合いのみを制御できる高分子固体の創製を目指した。既に出来上がった絡み合いを解くのは殆ど不可能と思われるが、新たに作ることなら分子鎖の運動の励起で可能であろう。そこで、絡み合いが極端に少ない高分子固体をこのプロジェクトの出発物質とする。その場合、熱処理によって絡み合いを作ることから、高分子の分子量は絡み合い形成臨界分子量より大きい必要がある。高分子鎖は貧溶媒中でグロビュールとなり析出する。溶液中や凝集中で安定なグロビュールがあるなら、上の条件に叶う適う出発物質となりうる。Sergeyev 等は DNA と陽イオン性界面活性剤の複合物が、アルコール中で安定なグロビュールとして存在していることを示した<sup>2)</sup>。これに倣い、本研究では DNA と陽イオン性界面活性剤の複合物を用いた。

## 2. 実験方法

DNA としてはサケ白子由来 20kbp のものを、陽イオン界面活性剤には、cetyltrimethylammonium-bromide(CTAB)を用いた。これらの水溶液をそれぞれ用意し混合する。得られる析出物が DNA-CTA である。析出物を十分洗浄のあと乾燥し、パウダーとする。フィルムは、DNA-CTA パウダーをエタノールに溶解し、濃縮の後キャストして乾燥したものである。

## 3. 結果と考察

図 1 は雲母壁界面にキャストした DNA-CTA 表面の AFM 像である。一面に均一な大きさの粒子を見ることができる。更に、部分的に高いところもみられ、その高さは下の層から一様に 30 nm 程度である。30 nm の高さの粒子の第 1 層に 30 nm の高さの粒子の第 2 層が載っているとみることができる。各層内では粒子の直径は 0.2~0.4  $\mu\text{m}$  であり、粒子は扁平な円盤状である。20 kbp 程度の DNA 分子について、0.2MNaCl 水+glycerol 溶液中の DNA (ランダムコイル)と、エタノール+glycerol 溶液中の DNA-CTA(グロビュール)の慣性半径の比は 0.3~0.39 であることが報告されている<sup>3)</sup>。一方同程度の長さの DNA 鎖の広がりには 0.2MNaCl 水溶液中で約 1  $\mu\text{m}$  とされていることから、エタノール溶液中での DNA-CTA 鎖の広がりには 0.4  $\mu\text{m}$  程度であることが予想される。図中の粒子径は、この値よりも少し小さ目であるが、乾燥により収縮することを考慮すれば、これらの粒子は DNA-CTA グロビュールであると考えられる。発表では、このフィルムを用いた誘電緩和および応力緩和実験の結果も示す。

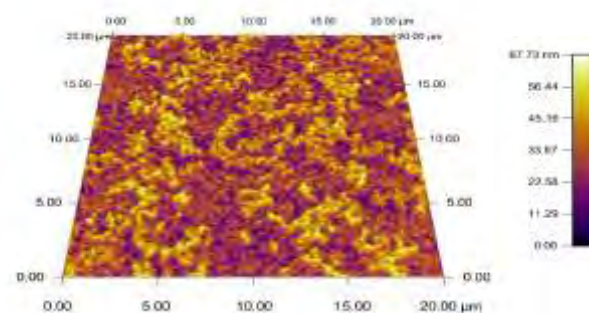


Figure 1. AFM image of DNA-CTA film.

## 文献

1. E-J Donth *Relaxation and Thermodynamics in Polymers*. Academy Verlag, Berlin, 1992.
2. V. G. Sergeyev, S. V. Mikhilenko, O. A. Pyshkina, I. V. Yaminsky, K. Yoshikawa *J Amer Chem Soc* **121**, 1780-1785 (1999).
3. N. Sasaki, H. Ashitaka, K. Ohtomo, A. Fukui *Int J Biol Macromol* **40**, 327-335 (2007).

## 蠕動運動による腸内気泡の運動

多羅尾範郎\*

\* 聖隷クリストファー大学 リハビリテーション学部 [〒433-8558 浜松市北区三方原町 3453]

### 1. 緒言

高齢化社会に備えて、QOLT(Quality of Life Technology の略)が求められ、老後の楽しみに直結する食道や胃腸の嚥下や消化の改善は重要な課題の一つである。腸内に発生したガスは、その分布や量によっては、腸の蠕動運動を阻害し、腸閉塞等の原因となる可能性がある。本研究は以下の2つの部分に分けられる。初めの部分は食物からガスがどのように発生し、それが重力によりどのように浮上するかの計算であり、後半は腸の蠕動運動により、降伏応力を持った粥状物質がどう動き、その中の微小ガス球がどう動く挙動を示すか、また、その結果蠕動運動にどのような影響をあたえるか、についての研究である。前半のガスの発生は主に、水素、炭酸ガス、アンモニア、硫化水素、メタン、等の通常ガスと、インドール、スカトール、フェノール、等の有毒ガスがあるが、ここでは、腸内ガス発生菌が、食物中に含まれる誘引物質に群がり、下記の様な化学変化でガスを発生するものをモデル化した。腸内において、典型的なガスは、必須アミノ酸の一つ Tryptophan:  $C_{11}H_{12}N_2O_2$  や類似の成分が変化した 3-Indolepropionic acid  $C_{11}H_{11}NO_2$  や前駆物質の Tryptamine:  $C_{10}H_{12}N_2$  + 炭酸ガス  $CO_2$  から発生する。また、これらから発生した Indole  $C_8H_7N$  や Skatole 3-Methylindole  $C_9H_9N$  は、悪臭があり、糞の臭気成分の1つであり、これらの反応は、腸内細菌の作用により促進される事が知られている。本計算は、この様にして腸内細菌によって発生したガスが、腸内の粥状物質内に、どのように影響し、何処へ輸送されるかを調べた。また、粥状物質の降伏応力とガス塊の大きさ、蠕動運動の関係で、ガス排出等にどのような事が言えるかも調べた。腸内の食物中の誘引物質に群がるガス発生細菌挙動を擬似実験する走化性数学的モデルで、発生ガスの成長と浮上速度を計算した。この計算は、ガスによる腸閉塞を防止するための体位変換の時間間隔を見積もるのに役立つと期待される。

### 2. 計算方法

本計算は、ガス発生バクテリア（細菌と略記）の拡張した Segel タイプモデルによる走化性移動モデル計算に従ったガスの成長・浮上速度計算、及び、蠕動運動によるガス泡分布の変化計算の2つについてそれぞれ計算方法と結果が分けられる。ガス発生計算は、球形の細菌（バクテリア）誘引

物質の周りに集まる細菌の時々刻々の密度分布を計算し、数密度×餌（誘引物質でもある）の濃度に比例してガスが発生すると仮定して計算した。境界条件と初期条件は、半径  $r=a$  の球形誘引物質塊周りに最初は一様に細菌が分布し、その後、誘引物質濃度勾配で集まる。細菌の動きと誘引物質濃度は拡張した Segel タイプモデルを使って計算した。

#### 2. 1 走化性細菌の拡張 Segel タイプモデル

境界条件と初期条件は球対称モデルにおいて、 $n = n_{\max}$  at  $r = a$ ,  $c = c_0$  at  $r = a$ ,  $n = n_0$  at  $r \rightarrow \infty$ ,  $c = c_B$  at  $r \rightarrow \infty$ , 等の境界条件と、初期条件:  $n = n_0$  at  $r = 0$  を仮定し、拡張した Segel タイプ走化モデルで動く誘引物質濃度や細菌の数密度変化は拡散方程式類似微分方程式  $\frac{\partial c}{\partial t} = D_c(n) \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left\{ r^2 \frac{\partial c}{\partial r} \right\} - n D_E(c)$  を満足するグリーン関数:  $c = \frac{dc_0}{dr} - \frac{1}{r} \int_0^r r'^2 \rho(r') dr' + \int_0^r r' \rho(r') dr' + c_B$  (ただし、 $\rho(r') = \frac{n(r')(1+\varepsilon_2 n) \Gamma c(r')}{D_c \{c(r') + C_2\}}$  は、細菌の数密度関数) であり、この2式で逐次近似し、 $n, c$  を計算できる。また、上記式の中の係数も、 $D_n(c) = 1 + \frac{4cC_0}{(c+C_0)^2}$ ,  $D_E(c) = \frac{K}{c}$ ,  $D_c(n) = \frac{D_{c0}}{(1+\varepsilon_2 n)}$ ,  $D_E(c) = \frac{\Gamma c}{(c+C_2)}$  で変え逐次計算した。この計算で、時々刻々のガス球の大きさが計算でき、その時の浮力を計算し、浮上速度を計算した。

#### 2. 2 蠕動運動によるガス泡分布の変化計算

蠕動運動の計算では、内部が降伏応力を持った解析的な解のある Casson 流体を使った。下式で、降伏応力は  $f_c$  大ズリ速度の粘性率が  $\eta_c$   $\sqrt{\dot{\gamma}} = \sqrt{\eta_c} + \frac{\sqrt{f_c}}{\sqrt{|\dot{\gamma}|}}$  であり、ワニス、溶融チョコ、細血管中血液、等で良く使われる。軸対称、凹んだところが速度  $U$  で移動するモデル、周りに消化液が付着している。この流れはかなり複雑だが、解析的な解がえられ、それを使い、各所の応力が得られる。この応力を使い、凹み率 0.3 の場合の蠕動運動を駆動する力を計算し、降伏応力が大きいと駆動に力を要する事もわかった。また、各場所での速度分布を計算することにより、狭窄の右側で一様に分布していた泡がやや軸方向へ寄ることがわかり、小さな泡は重力の影響がないため、蠕動運動の効果でコア周辺に集まって合体する事が少なくなり、腸閉塞になり易い事もわかった。

### 3. 結語

計算により、バクテリアによるガスの発生とその蠕動運動への影響を調べる事ができた。

## 気管支分岐付近での痰塊表面の剥離

多羅尾範郎\*

\* 聖隷クリストファー大学 リハビリテーション学部 [〒433-8558 浜松市北区三方原町 3453]

### 1. 緒言

気管支内に発生した痰栓が呼吸換気を妨げる事は周知の事実だが、この痰塊の付着は気管支の炎症部位や気管支分岐部付近に発生する事が多い。今回我々は気管支分岐部付近の一方の枝に付着した痰塊が、閉鎖していないもう一方の枝からの気流によって剥離する様をガラス分岐管による模擬実験で確認し、また、どんな条件でこのような剥離が起こるかを理論的に計算する事により調べる解析に成功したので、本学会で報告する。どの様なメカニズムで痰栓が外れるかは、著者も永年に渡り研究してきたが、いずれの場合にも、最終的には気道に付着した痰塊は気流による剥離か繊毛運動による輸送によってのみ体外に排出される。また、気流によって外れ損なった痰栓が、場合によって痰中の泡となる事が考えられるが、このような現象が喘息等で気管支内径が細い場合に起こりがちである事も、本研究によって明らかになるものと期待される。一方では、咳の様な速い気流での痰塊剥離においては、剥離した痰は微小な霧滴となり、泡とはならない。このように正常な咳による去痰の場合、痰の中に泡が発生する事は考え難いが、前述の様な気道の狭窄がある場合は、排気気流が十分流れない事により、流れの陰圧が十分でなく、したがって、衝撃波も生じなく、中途半端な気流による泡が生ずる場合も考えられる。泡の呼吸に対する影響では、多くの泡の発生、または巨大な泡の発生により、泡で気道がふさがり、換気を悪くする事が多いと思われる。本研究は、どの様な時に何処に泡が発生し易いかの理論的な考察とそれに関する擬似気管支内実験、及び、モデル計算を基に、痰の剥離を解析したものである。

### 2. 理論的考察と計算方法、及びその結果

泡発生のメカニズムは大きく分けて2つあると考えられる。(A) 気管支内の痰栓が泡を作るもの、(B) 気流によって壁に付着した痰が剥離して泡ができるもの、(A) の計算には Fig. 1 の様な気管支系の分岐モデルを利用し、Maple と Excel を使用した。結果は、気管支が硬く、界面活性剤の多く含まれた場合に泡が発生し易い事等がわかった。(B) の計算には、気流の速さと、痰塊の大きさ・痰の降伏応力・表面張力・等、多くの物性値が関係

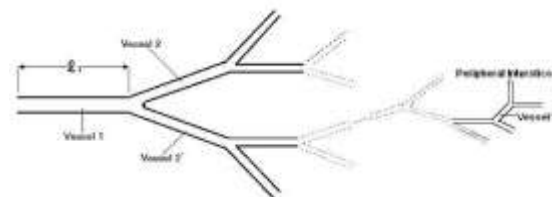


Fig.1 Geometry of the Model: Sputum Plug Embedded in Respiratory System

する事がわかったが、この内、界面活性剤濃度が大きく影響する表面張力に注目して解析を行った。計算結果の一部は、Fig. 2 に表わされている。

同じ気流の速さ

の場合、表面張力が大きい場合程、大きな塊になるまで剥離されない事がわかる。計算は、発生した泡の崩壊可能性も行った。

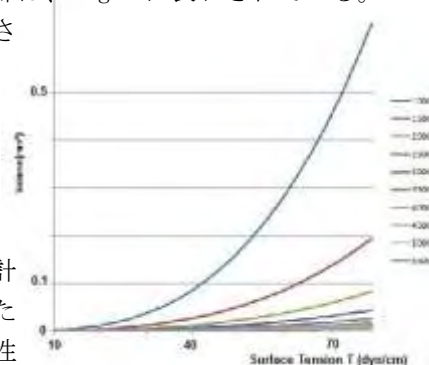


Fig.2 Maximum volume of the sputum drop

### 3. 実験方法と結果

右図の様なガラス分岐管にスポイトで適度な圧力で気流を送り、もう一方の分岐から、表面張力のわかった着色水を適度に押出し、着色水塊が気流によって剥離する様を高



速ビデオカメラにより撮影した。界面活性剤により表面張力が弱まった着色水の場合、分岐に達した僅かな塊からも剥離が起こり、それが気流により泡となる様子が撮影された。また、気流が速いと泡が細くなる事も確認され、咳等での気流で痰が微小な霧滴となる事が示唆された。

### 4. 考察

理論的計算と模擬実験から、分岐の一方の枝から押し出された痰がもう一方の枝からの気流により剥離する事がわかり、一回に剥離する痰量は、表面張力が増えると増加し、気流が速いほど、少なくなる事がわかった。

### 5. 結言

分岐で痰塊が剥離する様子が、その模擬実験中のビデオ撮影で確認され、理論的計算により解析された。

## マイクロチャネルデバイスを用いた細胞遊走時の牽引力計測

大橋 俊朗\*, 菅原 章人\*, Justin Cooper-White\*\*

\*北海道大学 大学院工学研究院 [〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目]

\*\*Australian Institute for Bioengineering and Nanotechnology, The University of Queensland, Australia

### 1. 緒言

細胞遊走は組織の修復や再生などの恒常性の維持に関わる細胞の基本的な機能であり、がんの発生や転移など様々な疾患の発達や治癒においても重要な役割を果たす。接着細胞は焦点接着斑を介し細胞外基質に対し引張り力（細胞牽引力）を発生させることが知られている。細胞遊走中の牽引力を計測することで細胞遊走のメカニズムをより詳細に把握できることが期待できる。

そこで本研究では、細胞牽引力計測のためのマイクロピラーを実装したマルチチャネル細胞遊走デバイスを新たに開発し、細胞遊走時の牽引力計測を行った。

### 2. 実験方法

フォトリソグラフィ技術およびソフトリソグラフィ技術を用いて製作したポリジメチルシロキサン製のマイクロピラー実装マルチチャネルデバイスの概略図を図 1 に示す。このデバイスは、Cooper-White ら<sup>1)</sup>が作製したマルチチャネルデバイスを参考に、細胞をコンフルエント状態まで培養させるために設けられた液溜め部（15.8 mm x 16 mm）、およびその片側に接続された、細胞が遊走するための複数の微小流路（幅 200  $\mu\text{m}$ 、高さ 50  $\mu\text{m}$ ）により構成されている。微小流路は 6 本で 1 組を成し、それら 6 本の一端が 1 つのシリンジポートに接続するように、合計 4 組 24 本の微小流路および 4 つのシリンジポートを設けた。拡大図に示すように、微小流路 1 組内の 6 本の微小流路について左から順に流路 1~6 とした。流路 1 および 6 は底面にマイクロピラーが組み込まれていない参照用流路として用い、流路 2~5 は遊走時の細胞牽引力が計測できるように底面にマイクロピラー（高さ 6.5  $\mu\text{m}$ 、直径 2 - 3  $\mu\text{m}$ 、中心間距離 5 - 8  $\mu\text{m}$ ）を組み込んだ。10% FBS を添加した DMEM 培地を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の環境下で NIH 3T3 細胞を培養し、実験に使用した。

### 3. 実験結果

個々の細胞の細胞群内部における相対的位置に着目すると、常に最前列に位置する細胞や常に内部に位置する細胞が存在する一方、最初は最前列に位置するが時間と共に大きく変化させ徐々に内部に入り込む細胞が観察された。細胞は細胞群内

部に入り込むにつれて牽引力は小さくなる傾向が認められ、いずれの細胞においても牽引力の増減に伴い面積が増減する傾向を示した。

### 4. 考察

細胞群の遊走時における同一の細胞の経時観察を行ったところ、牽引力変化と同時に面積も変化する傾向を示した。これは面積が変化することで形成し得る焦点接着斑の数量も変化するることによって細胞が基質に対し発生する牽引力が変化したと考えられる。以上のことより細胞群の遊走においては、細胞群内部に位置する細胞はただ牽引力が低下するだけでなく速度および面積も同時に減少しており、また細胞間結合力を能動的に変化させながら進むものと考えられる。

### 5. 結言

本研究では、細胞群遊走時の牽引力計測が可能なデバイスを用いて、細胞の速度計測、形態変化観察および牽引力計測を行うことに成功した。

### 謝 辞

本研究の一部は、日本学術振興会二国間交流事業共同研究（オーストラリア）、文科省科研費基盤 B（24300157）および挑戦的萌芽研究（25560187）の援助を受けた。記して謝意を表する。

### 文 献

- 1) Doran, M.R., Mills, R.J., Parker, A.J., Landman, K.A., and Cooper-White, J.J.: A cell migration device that maintains a defined surface with no cellular damage during wound edge generation, *Lab on a Chip*, **9**, 2364-2369, 2009.

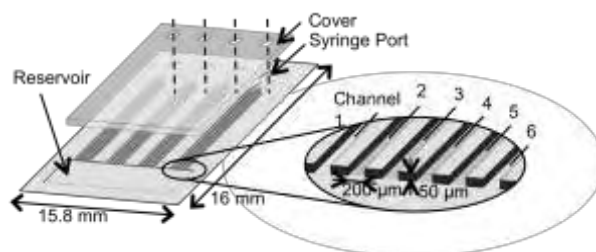


Fig. 1 Multichannel device equipped with micropillars.

## AFM を用いたアクチンフィラメントの曲率依存的な ARP2/3 との相互作用変化測定

韓 成雄, 森田 恭平, 安達 泰治

\* 京都大学 再生医科学研究所 [〒606-8507 京都市左京区聖護院 53]

### 1. 緒言

アクチンフィラメントは細胞骨格構造の基本単位であり, 細胞内・外環境変化に対して適応的に網目構造や束構造などの高次のネットワーク構造を作り, 細胞の運動や形態形成を支えている. アクチンネットワーク構造は, アクチンフィラメントとアクチン結合タンパク質との相互作用により構築され, 力学的因子や生化学的因子の影響を受け, その構造をダイナミックに変化させている<sup>(1)</sup>. アクチンダイナミクスの定量的な計測は細胞と組織の生命活動を理解するための非常に重要な課題である. 本研究では原子間力顕微鏡(Atomic Force Microscopy: AFM)単分子相互作用測定法<sup>(2)</sup>を利用したアクチンフィラメントとアクチン結合蛋白質の相互作用測定法を用いることにより, アクチンフィラメントの曲率依存的な Arp2/3 との相互作用変化計測を試みた.

### 2. 実験方法

AFM 探針を 3-Aminopropyltriethoxysilane でシラン化し, 架橋剤である Sulfo-EMCS を用いて, Arp2/3 を化学修飾した. フォトリソグラフィーにより作製した波状基盤と平面基盤上に対して, それぞれ酸化グラフェンを吸着させた状態で重合させたアクチンフィラメントを化学修飾した. Arp2/3 固定化 AFM 探針とアクチンフィラメント固定化マイカ基板を用いてフォーススペクトロスコピーを行った. 得られたフォースカーブから, Arp2/3 とアクチンフィラメントの結合破断力を判定し, そのヒストグラムを作成した.

### 3. 実験結果および考察

荷重負荷速度 12400 pN/s において波状基盤と平面基盤上に対して得られたフォースカーブからそれぞれの結合破断力のヒストグラムを作成した. 得られたヒストグラムに対してガウスフィッティングを行い, 最初ピークの平均値を求めた(Fig. 1). Arp2/3 とアクチンフィラメントの結合破断力の平均値は, 平面基盤の場合  $43.3 \pm 9.8$  pN であるのに対して, 波状基盤では  $52.6 \pm 19.4$  pN であった.

結合破断力の平均値は, 平面基盤に対して波状基盤の場合 10 pN 程度上昇し, 標準偏差も波状基盤の方が大きくなった. この結果により, アクチンフィラメントと Arp2/3 の相互作用は, アクチンフィラメントの曲率に依存することが示唆された.

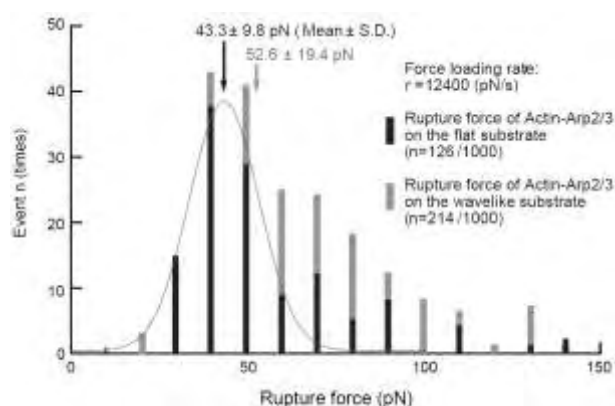


Fig. 1. Rupture forces histogram of actin filament/Arp2/3 complex interaction on normal and wave-like substrate using AFM.

### 4. 結論

本研究では, AFM を用いて, 平面基盤と波状基盤上に修飾されたアクチンフィラメントと Arp2/3 との相互作用計測を行った. その結果, アクチンフィラメントの曲率に依存して Arp2/3 との相互作用が変化することが分かった. 今後, アクチンフィラメントの曲率と相互作用の関係を定量的に分析する予定である.

### 謝 辞

本研究は, 一部, 日本学術振興会「最先端・次世代研究開発支援プログラム」(LR017)による援助を受けた.

### 文 献

- 1) Risca, V. I. et. al.,: Actin filament curvature biases branching direction. PNAS, **109**, 2913-2918, 2012.
- 2) Han, S. W. et. al.,: Probing actin filament and binding protein interaction using an atomic force microscopy. J. Nanosci. Nanotechnol., In press.



## 細胞のマクロ形態とナノ構造の力学的制御

出口真次<sup>1</sup>, 松井翼<sup>2</sup>, 齋藤明<sup>3</sup>, 佐藤正明<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 東北大学 現名古屋工業大学共同ナノメディシン科学専攻 [〒466-8555 名古屋市昭和区御器所町]

<sup>2</sup> 東北大学生命科学研究科

<sup>3</sup> 東北大学医工学研究科 現工学研究科

<sup>4</sup> 東北大学医工学研究科・工学研究科 現東北大学学際科学フロンティア研究所

### 1. 緒言

細胞の形態を規定することができるマイクロパターンは、細胞の機能を研究するうえで重要なツールとなっている。例えば、細胞の分化やアポトーシス<sup>1</sup>、紡錘体の極性<sup>2</sup>、接着斑タンパク質の局在<sup>3</sup>を、マイクロパターンによって人為的に誘導・制御できることが明らかとなっている。一方、細胞機能の多くは、細胞のマクロな形態だけでなく、細胞内部の接着斑に作用する張力の大きさにも依存していることが分かりつつある<sup>4</sup>。しかし、細胞のマクロ形態と、接着斑のナノ構造を独立に人為操作して両者の関与を相対的に調べる試みはあまりなされていない。本発表はこの二つの階層をそれぞれ力学的に制御できる実験系、およびそれによって得られる実験結果を示す。

### 2. 実験方法

シリコーンゴム (PDMS) シート上に微小で滑らかなシワの列 (微小溝) を作る。ただしこの微小溝を作る領域を限定し、微小溝以外の領域は平坦にする。この局在微小溝領域だけで細胞が接着できるように局所的にゼラチンコートを行う。この微小溝のシワの周期はおおよそ 300 から 600nm の範囲で、また高さは 75 から 200nm の範囲で調節可能であり、そこに直接接着する接着斑のサイズを制御することができる。また、微小溝の局在領域のサイズや形を調節して細胞の形態を制御できる。この微小溝付きマイクロパターンに平滑筋細胞株 A7r5 細胞を培養し、細胞のマクロ形態と接着斑の方向を独立に制御して、フェノタイプの違いを調べた。

### 3. 実験結果と考察

A7r5 細胞を短軸長さが約 25 $\mu$ m の長方形マイクロパターン上に培養した。さらにそのマイクロパターン内に微小溝を作り、接着斑の方向を制御した。微小溝のないマイクロパターン上では、接着斑およびストレスファイバーが長方形マイクロパターンの長軸方向に発達した (図 1 上)。また、マイクロパターンの長軸方向に微小溝を並べたときにも同様の傾向が観察された。一方、微小溝を

マイクロパターンの短軸方向に並べた場合では、長軸方向に接着斑とストレスファイバーは発現せず、代わりに細胞周囲に顕著な仮足の発現が観察された (図 1 下)。仮足の形成を促す Rac1 の阻害剤によりこの仮足が抑制されることを確認した。このようにマクロな細胞形態が同じでも、接着斑の方向を 90 度変えると、異なるフェノタイプが現れることがわかった。この新しいマイクロパターンは、細胞スケールおよび接着斑・ストレスファイバーの分子スケールという異なる階層の整合性が果たす役割を解明しうる新しい実験系と言える。

### 文 献

- 1) Pitaval, A. et al., Cell shape and contractility regulate ciliogenesis in cell cycle-arrested cells. *J. Cell Biol.* 191, 303-312, 2010.
- 2) Théry, M. et al., Experimental and theoretical study of mitotic spindle orientation. *Nature* 447, 493-496, 2007.
- 3) Deguchi, S. et al., The position and size of individual focal adhesions are determined by intracellular stress-dependent positive regulation. *Cytoskeleton* 68, 639-651, 2011.
- 4) 齋藤, 他, 細胞基質間接着分子構造の発達と細胞内張力の関係 について. 第 25 回バイオエンジニアリング講演会, 2013.

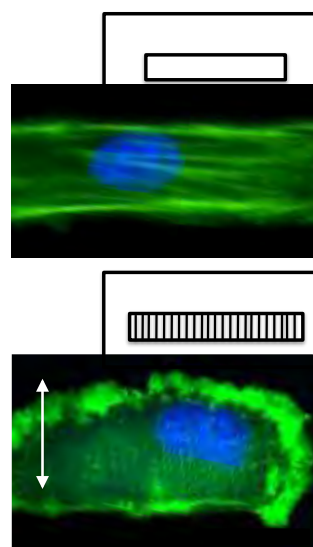


図 1 二種類のマイクロパターン上に培養した細胞 (F-actin と核を染色) . 矢印: 微小溝の方向.

## 間質流制御による 3 次元血管ネットワークの形成

阿部順紀\*、谷下一夫\*\*、須藤亮\*

\*慶應義塾大学理工学部システムデザイン工学科 [〒223-8522 神奈川県横浜市港北区日吉 3-14-1]

\*\*早稲田大学ナノ理工学研究機構

### 1. 緒言

再生医療の展開には、血管新生の制御が重要である。特に、血管新生の制御因子として、力学的因子（間質流、せん断応力）と生化学的因子（VEGF など）が必要不可欠である。近年、生体外 3 次元モデルを用い、3 次元血管ネットワーク形成に及ぼす間質流と VEGF の相乗効果が注目され始めている<sup>1)</sup>。しかし、従来研究<sup>1)</sup>で用いた間質流の流速は生理的条件<sup>2)</sup>よりも遥かに速く、流速の遅い間質流がネットワーク形成に及ぼす影響は不明である。ネットワーク形成はせん断応力の大きさに依存するため<sup>3)</sup>、間質流に関しても同様の可能性が期待される。そこで本研究では、マイクロ流体デバイスを用いて、3 次元血管ネットワーク形成に及ぼす間質流の大きさ依存性を調べた。

### 2. 実験方法

2 つのマイクロ流路とその間にコラーゲンゲルを有するマイクロ流体デバイスを作製した (Fig. 1A)。血管内皮細胞を Lower channel に播種し、24~48 時間後にコンフルエントに達した。次に、Upper channel から 3 つの異なる大きさの間質流 (0.07, 0.71, 4.29  $\mu\text{m/s}$ ) を 5 日間負荷した (Fig. 1B)。培養液には 20 ng/ml VEGF を添加した。間質流負荷 5 日後に細胞の固定、蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡により 3 次元ネットワークの構造を解析した (Fig. 1C)。

### 3. 実験結果

間質流負荷 5 日後、形成された 3 次元ネットワークの長さや密度、内腔の直径、ネットワーク根元でのゲル溶解の面積は間質流の大きさに依存した。本研究では、生理的条件に最も近い 0.71  $\mu\text{m/s}$  において安定したネットワークが形成された。

### 4. 考察

ネットワーク形成が間質流の大きさに依存した原因として、間質流の大きさと VEGF 供給量の関係を調べた。本研究で用いた間質流 4.29  $\mu\text{m/s}$  は、0.71  $\mu\text{m/s}$  の 6 倍の大きさのため、VEGF 濃度が等しいため細胞に供給される VEGF の量も 6 倍となる。そこで、本研究では 4.29  $\mu\text{m/s}$  と 0.71  $\mu\text{m/s}$  において VEGF 供給量が等しい条件を用意し、間質流負荷実験を 5 日間行った。しかし、VEGF 供給量が等しくても間質流の大きさが異なれば、形成されたネットワーク構造も異なることがわかった。したがって、ネットワーク形成には、間質流の大きさと VEGF 供給量の組み合わせが重要である。

### 5. 結言

3 次元ネットワーク形成は間質流の大きさに依存しており、生理的な間質流の流速において血管長が最も長くなることがわかった。

### 謝 辞

本研究はJSPS 科研費 22680037 の助成を受けたものである。

### 文 献

- 1) Song, JW. and Munn, LL.: Fluid forces control endothelial sprouting. *Proc Natl Acad Sci USA*, **108**, 15342–15347, 2011.
- 2) Chary, SR. and Jain, RK.: Direct measurement of interstitial convection and diffusion of albumin in normal and neoplastic tissues by fluorescence photobleaching. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 5385–5389, 1989.
- 3) Kang, H. Bayless, KJ. and Kaunas, R.: Fluid shear stress modulates endothelial cell invasion into three-dimensional collagen matrices. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **295**, H2087–H2097, 2008.

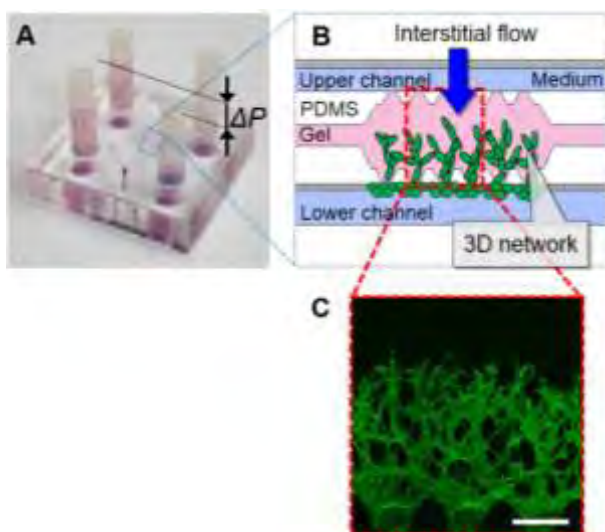


Fig. 1 Schematic of a microfluidic device. Scale bar = 300  $\mu\text{m}$ .



## 低酸素環境下でのニューロン活性化が脳血管へ与える影響

荒井雅貴\*, 佐藤竜也\*\*, 工藤奨\*\*\*

\*九州大学大学院 工学府 機械工学専攻 [〒819-0396 福岡県福岡市西区元岡 744 番地]

\*\*芝浦工業大学大学院 理工学部 機械工学専攻 [〒135-8548 東京都江東区豊洲 3-7-5]

\*\*\*九州大学大学院 工学研究院 機械工学部門 [〒819-0396 福岡県福岡市西区元岡 744 番地]

### 1. 緒言

脳の細胞は高次脳機能を維持するためエネルギー要求性が高いが、細胞自体にエネルギー貯留がほとんどないため、低酸素環境に置かれると、急速に機能が低下する<sup>(1)</sup>。低酸素状態が続くことで発症する低酸素性虚血性脳症(Hypoxic ischemic encephalopathy)は特に大脳皮質を侵食し、不可逆的な脳細胞死によって高次機能障害を引き起こす<sup>(1)</sup>。そのため低酸素環境から脳細胞死を防ぐ脳神経保護の研究が進められている。

脳細胞には神経細胞(ニューロン)とグリア細胞があり、ニューロンは脳の神経活動を担い、他のニューロンとシナプスと呼ばれる接合部を介して情報伝達をおこなっている。ニューロンと低酸素に関する研究は海馬領域において最も研究が進んでいるが、大脳皮質に関する研究は少なく、大脳皮質に存在するニューロンの活性化が脳血管の調整にどのような影響を及ぼしているかについては不明な点が多い。

本研究では、低酸素環境における大脳皮質でのニューロンと脳血管の機能的な繋がりについて着目し、通常酸素環境下と人為的な低酸素環境下で、電気生理学的手法を用いて大脳皮質のニューロンを活性化させ、活性化前後での脳血管径の変化を観測する実験系を構築し、2つの環境下での血管径の変化を比較した。

### 2. 実験方法

#### 2. 1 実験動物及び脳スライスの作製方法

3-4 週齢の Wistar ラットの雄を麻酔にかけ断頭し、脳を摘出した。摘出した脳はスライサーを用いて、厚さ 300  $\mu\text{m}$  の脳スライスを作製した。

#### 2. 2 電気生理学的記録

ニューロンの電位応答記録は単電極膜電位固定用増幅器(CEZ-3100, NIHON KOHDEN)を使用し、微小ガラス電極に電極内溶液を充填させ、WholeCell Patchclamp 法を用いて記録した。

#### 2. 3 低酸素負荷

低酸素負荷は 95 %  $\text{O}_2$ , 5 %  $\text{CO}_2$  でバブリングした通常の aCSF から 75%  $\text{N}_2$ , 20%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$  の混合ガスで aCSF を通気した低酸素溶液に切り替え、1-2ml/min で連続的に灌流することで低酸素を負荷した。

#### 2. 4 Synapse 活性化刺激

通常酸素環境下と低酸素環境下におけるニューロンの活性化に伴う血管径の変化を観察する為に、大脳皮質 IV 層に aCSF を充填した細胞外微小ガラス電極を設置し、電流刺激装置によりニューロンに対して神経活動を活性化させる刺激である Synapse 活性化刺激を通常酸素環境下と低酸素環境下においてそれぞれ与えた。

### 3. 実験結果

#### 3. 1 低酸素環境時の Synapse 活性化刺激が血管径に与える影響

低酸素環境におけるニューロンの活性化が脳血管径に影響を及ぼすかを調べる為に、通常酸素環境と低酸素環境のそれぞれにおいて Synapse 活性化刺激によりニューロンを活性化させた場合の脳血管径を観察した。Fig. 1 より通常酸素環境(Normoxia)下において、血管径は時間とともに Control から約 88%収縮した。一方、低酸素環境(Hypoxia)下において同一の血管径は、Control から約 106%に拡張した(Fig.1)。

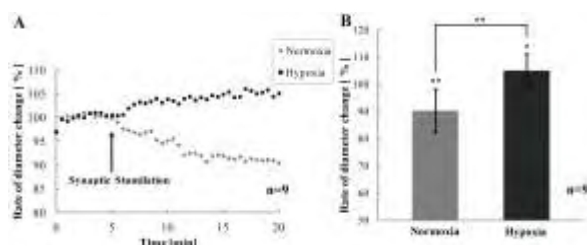


Fig.1 通常酸素環境下と低酸素環境下での脳血管径の変化(\*\*P<0.01: Normoxia vs Hypoxia, Control vs Normoxia. \*P<0.05 Control vs Hypoxia.)

### 4. 結言

ニューロンが活性化することにより脳血管は通常酸素環境下では収縮し、低酸素環境下では拡張することが確認できた。ニューロンの活性化が脳血管径の変化に対して、酸素濃度の違いにより異なる影響を与えていることが示唆された。

### 文 献

- 1) Calvert, J.W., Yin, W., Patel, M., Badr, A., Mychaskiw, G., Parent, A.D., Zhang, J.H.: Hyperbaric oxygenation prevented brain injury induced by hypoxia-ischemia in a neonatal rat model. Brain Research, Vol. 951, pp.1-8, 2002

## 肝星細胞の遊走における力学刺激と受容体の関連性

隅井干城\*, 藤田陵佑\*\*, 岩下洸\*\*\*, 工藤奨\*\*\*\*

\*九州大学大学院 工学府 機械工学専攻 [〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744]

\*\*芝浦工業大学大学院 理工学研究科 機械工学専攻 [〒135-8548 東京都江東区豊洲 3-7-5]

\*\*\*芝浦工業大学 工学部 機械工学科

\*\*\*\*九州大学大学院 工学研究院 機械工学部門

### 1. 緒言

肝星細胞は肝臓に存在する細胞であり、肝硬変と密接な関わりを持つと考えられ、肝硬変の際には周囲の肝組織から炎症部位に肝星細胞が遊走することが報告されている<sup>1)</sup>。肝星細胞は肝硬変の原因となる細胞外マトリクスなどの物質を産生しているため<sup>2)</sup>、炎症部位への肝星細胞の遊走は肝硬変の悪化に深く関与していると考えられる。従来、薬剤刺激による肝星細胞の遊走については調査されているが<sup>3)</sup>、血流などの流れによって生じるせん断応力が遊走に与える影響についての研究は行われていない。一方、肝細胞の遊走には血小板由来増殖因子(Platelet-derived growth factor-BB: PDGF-BB)などのタンパク質性因子によって引き起こされていることが知られている<sup>3)</sup>。

そこで本研究では、肝星細胞にせん断応力を負荷した際の遊走変化を測定し、遊走に及ぼす力学刺激と受容体発現量の影響について調査した。

### 2. 実験方法

肝星細胞をφ60 mm ディッシュ(IWAKI)に培養し、マイクロピペットで細胞を剥離させ傷をつけた。その後、平行平板型フローチャンバーでせん断応力を 9 時間負荷した。せん断応力の大きさは静置状態、生体内を模擬した 0.6 Pa、血流増加時を想定した 2 Pa の 3 種類とした。遊走測定を行う細胞は流れの上流側と下流側に存在する細胞とし、遊走の測定は傷の幅の変化を定量化することで評価した。PDGF-BB 受容体発現量の測定には蛍光免疫染色法により蛍光輝度を指標とした。実験データは Scheffe 法を用いて検定を行った。

### 3. 実験結果

せん断応力負荷時における肝星細胞の遊走の測定結果を図 1(a)に示す。肝星細胞の遊走距離は 2 Pa、静置状態、0.6 Pa の順に長くなった。次に各条件における受容体の発現量を図 1(b)に示す。すべての条件において PDGF-BB 受容体発現量に有意な差は見られなかった。

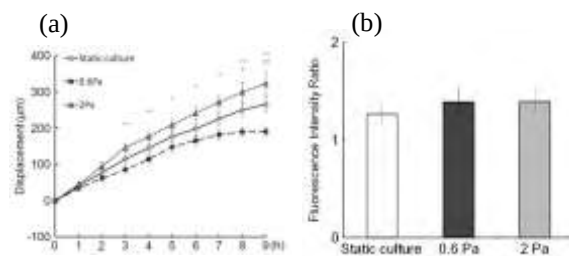


Fig. 1 Difference of hepatic stellate cell in upper stream

(a) migration, (b) receptor-expression

( $P^* < 0.05$ ,  $N=3$ ,  $n=24$ )

### 4. 考察

図 1 より肝細胞の遊走や受容体発現量には流れの大きさが影響していることが明らかとなった。2 Pa せん断応力を負荷した肝星細胞の遊走距離は静置状態より長く、PDGF-BB 受容体の発現量も静置状態と同じであった。これは、2 Pa の流れ負荷時では PDGF-BB ではなく流れによる力によって細胞が遊走したと考えられる。一方、0.6 Pa のせん断応力負荷時では流れが存在するにも関わらず遊走距離が静置状態より短く、PDGF-BB 受容体の発現量も静置状態と同じだった。これより、0.6 Pa せん断応力は PDGF-BB 以外の要因に影響を与え、肝星細胞の遊走を抑制していると考えられる。

### 5. 結言

本研究から、肝星細胞の遊走において力学刺激と受容体に関連性があることが示唆された。

### 文 献

- 1) Liu, Z. *et al.*: Blebbistatin inhibits contraction and accelerates migration in mouse hepatic stellate cells. *Br. J. Pharmacol.*, **159**, 304-315, 2010.
- 2) Friedman, S. L. *et al.*: Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiological reviews*, **88**, 125-172, 2008.
- 3) Kinnman, N. *et al.*: PDGF-mediated chemoattraction of hepatic stellate cells by bile duct segments in cholestatic liver injury. *Laboratory Investigation*, **80**, 697-707, 2000.

## 内臓循環系に及ぼす脊髄損傷の影響と再生医療について

飯田 紀子\*

\* 北海道文教大学・人間科学部・理学療法学科 [〒061-1449 北海道恵庭市黄金中央 5 丁目 1 9 6 - 1 ]

## 1. 緒言

この研究の目的は、脊髄損傷が局所脈管機能にどのような影響を及ぼすかを理解するために、胸髄 1 (Th1) の部位で脊髄切断 (spinal transection) を行った時の局所血流量と血流自己調節 (flow autoregulation) に及ぼす効果が無麻酔下のラットにおいて検討することにある。

## 2. 実験方法

腹腔動脈及び上腸間膜動脈の血流量は電磁血流計プローブの埋め込み実験により無麻酔下で測定を行った。血圧は腹部大動脈末端の部位で、大腿動脈から挿入したカテーテルにより測定した。薬物の静注は右外頸静脈に挿入したカテーテルを通して行った。Spinal transection はエーテル麻酔下で頸髄と胸髄の境界にある突起を除去することにより Th1 の部位で行った。交感神経節のブロックには hexamethonium bromide (C6:25mg/kg iv) を、また spinal transection による血中バゾプレシン濃度の変化は vasopressin antagonist (VPA:0.01 mg/kg iv) を用いて測定を行った。

本研究における動物実験は日本生理学会及び広島大学医学部の倫理規定に従い行った。

## 3. 実験結果

腹腔動脈流域の血管抵抗は、intact rat (spinal transection を行わないラット) では正常ラット (NCR) 及び本態性高血圧ラット (SHR) 共に C6 の投与により有意に減少したが、spinal rat (spinal transection を行ったラット) の NCR 及び SHR については C6 による有意の変化は無かった。また、spinal transection による血中 VP 濃度の上昇は SHR のみに観察された。一方、上腸間膜動脈流域の血管抵抗については、intact rat の NCR 及び SHR には有意の変化は無かったが、spinal rat では NCR 及び SHR で有意に減少し、血中 VP 濃度は両ラットで有意に上昇した。次に、flow autoregulation は、腹腔動脈流域では spinal transection により消失し、両ラットの血流量は血圧の減少と共に減少した。しかし、上腸間膜動脈流域では spinal transection により両ラットの血流量は有意に減少したが、flow autoregulation はその後も維持されていた。

この腹腔動脈、上腸間膜動脈流域の実験データはすでに測定されている頸動脈 (1, 2)、腎動脈 (1, 2)、腹部大動脈末端 (1, 2, 3) 流域の実験データと総合することにより、内臓脈管機能に及ぼす脊髄損傷の影響について更なる検討を行った。

## 4. 考察

実験結果から次の点が明らかになった。

[1] 腹腔動脈、下肢動脈の神経緊張の origin は上脊髄性で、それは SHR において亢進していた。

[2] 上腸間膜動脈、頸動脈、腎動脈の神経緊張の origin は脊髄性であったが、上腸間膜動脈の緊張は intact の状態では圧受容器反射 (baroreflex) を介して抑制されていた。

[3] Flow autoregulation は spinal transection により腹腔動脈流域では消失したが、上腸間膜動脈流域では維持されていた。しかし、上腸間膜血流量は spinal transection により有意に減少した。

[4] 頸動脈 (脳血流)、腎動脈、腹腔動脈、上腸間膜動脈、腹部大動脈末端 (下肢骨格筋血流) における平均血流量の総和は spinal transection により著しく減少した。これは容量 (静脈) 血管の拡張で心臓への還流血流量が減少し、心拍出量が減少したことを示している。

## 5. 結言

結論として、脊髄損傷により腹腔動脈及び上腸間膜動脈流域の脈管機能は腹腔流域では flow autoregulation の消失により、上腸間膜流域では血流量の減少により侵害されていることが分かった。特に、肝循環系では容量血管の拡張で肝静脈圧及び門脈圧が上昇し、門脈側副経路の血流上昇による食道静脈瘤、腹水の貯留、臍傍静脈の怒張の発生で生命に係る障害の生じる可能性が考察された。これらの障害を修復するにはヒト iPS 細胞による脊髄損傷への再生医療の応用が期待される。

## 文 献

- 1) Iriuchijima, J. and Sakata, S.: Regional difference in sympathetic vasoconstrictor tone in conscious rats. *Jpn. J. Physiol.*, **35**, 1051-1063, 1985.
- 2) Iriuchijima, J.: Regional distribution of vasoconstrictor tone in acute spinal rats. *Jpn. J. Physiol.*, **40**, 907-914, 1990.
- 3) Iriuchijima, J.: Supraspinal origin of abnormal hindquarter vasoconstrictor tone in spontaneously hypertensive rats. *Tohoku J. Exp. Med.*, **167**, 115-119, 1992.

## 骨粗鬆症による脊椎の変形と腹部大動脈瘤の関係 —共同研究者を求めています—

本田 透\*

\* 香川県立中央病院 リハビリテーション科 [〒760-8557 香川県高松市番町 5 丁目 4-16]

### 1. 緒言

骨粗鬆症は脈管系に動脈硬化などの質的な変化を招くので、慢性腎疾患や糖尿病、高血圧症などの生活習慣病との関係が注目されている。一方、演者は、高齢の腹部大動脈瘤 (AAA) の患者に骨粗鬆症による脊椎圧迫骨折が多発していることを知り、両者の合併状況を調べ、骨粗鬆症性の脊椎変形が形態的に AAA の誘因・増悪因子になると考えるようになった。演者は、この調査結果を示し、動脈硬化や石灰沈着が生じた大動脈が、脊椎の変形に伴い弯曲・屈曲したときの血流動態や動脈壁にかかるストレスの変化をコンピューターシミュレーションで評価できる研究者の協力を仰ぎたい。

### 2. 実験方法

2008 年 5 月以降の 3 年間に当院でステント内挿術を受けた AAA 115 例中 3D-CT 矢状断像がある男性 63 例(75.3±8.3 歳)、女性 21 例(80.2±7.3 歳)を、大動脈と AAA の形状で分類し (下表)、合併する既存脊椎骨折を半定量(SQ)評価法に準じて評価し (下図)、群毎に集計し比較した。次に、別の 20 例で腰椎機能撮影 X-P 上の第 12 胸椎と第 4 腰椎の前方 1.5cm の点の距離(D)の動的变化を調べた。

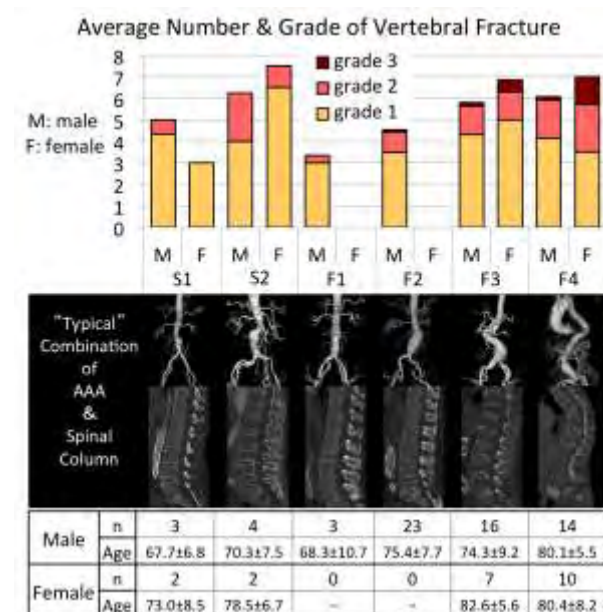
| AAA の分類  | 嚢状 (Saccular) |      | 紡錘状 (Fusiform) |      |      |          |
|----------|---------------|------|----------------|------|------|----------|
|          | S1            | S2   | F1             | F2   | F3   | F4       |
| 腹部大動脈の形状 | 屈曲角度          |      | 屈曲角度           |      | 複合弯曲 | 胸部から連続弯曲 |
|          | <40°          | ≥40° | <40°           | ≥40° |      |          |



### 3. 実験結果

嚢状瘤 11 例中 7 例、紡錘状瘤 73 例中 69 例に大動脈の弯曲・蛇行があった。全例に脊椎骨折があり、動脈変形が重度な群ほど骨折数が多く高 Grade の骨折が多

かった (下図)。また、体幹前屈により、D は平均 1.5cm 短縮し腹部大動脈が更に圧縮される可能性を伺わせた。



### 4. 考察

AAA の発生と進展には遺伝・環境・免疫学的要因・血流の変化などの多因子が複合的に関与しているとされが、血流の変化の原因とその予防の重要性については言及されていない。骨粗鬆症による脊椎の変形は、AAA の原因となる可能性がある。骨粗鬆症、AAA とともに、重症になって初めて認知されることが多いので、両者の発生と進展を経時的に観察することは容易でない。演者は、この病態を検証する手段として、流体力学的シミュレーションが有効と考える。なお、発展的に考察すれば、大動脈の変形は臓器への血流低下を引き起こし、慢性の内臓疾患の誘因にもなりえるので、脊椎変形は可能な限り予防したい。

### 5. 結言

骨粗鬆症性骨折の発生は治療薬の発達などにより制御できる時代になった。骨粗鬆症の予防と治療は、運動機能低下を防ぐばかりではなく、質的・形態的に大動脈の変化を防ぎ AAA を予防するための方策としても重視されるべきである。

## 粥状動脈硬化斑の伸展試験

山田 宏\*, 坂田 則行\*\*

\* 九州工業大学 大学院生命体工学研究科 [〒808-0196 福岡県北九州市若松区ひびきの 2-4]

\*\*福岡大学 医学部

### 1. 緒言

血液中の脂質が動脈の内膜に侵潤して粥腫となり、さらに粥腫と血液の間に位置する内膜は線維被膜化が進んで、粥状動脈硬化斑が発達する<sup>1)</sup>。

Holzapfel らは粥腫の発生した腸骨動脈を内・中・外膜の3層に剥がして単軸引張り試験を行い、応力-ひずみ関係から各層の力学特性を調べており、標本毎に異なる挙動が見られた<sup>2)</sup>。この結果が示すように動脈硬化斑の状態は各々異なっており、データの積み重ねが必要である。

冠動脈や頸動脈は動脈硬化の好発部位としてよく知られているが、大動脈にも動脈硬化斑の形成が認められる。大動脈は動脈に比べて管径が大きく、切り出した試験片の曲率が小さいので、伸展試験に適している。そこで本研究では、大動脈プラークの線維被膜を対象として伸展試験を行った。

### 2. 実験方法

福岡大学医の倫理委員会の承認を受けて、剖検例におけるヒト大動脈の動脈硬化プラーク領域の線維被膜を対象として単軸伸展試験を行った。試験装置は容量 5N のロードセル、自動ステージ、レーザ変位計、生理食塩水で満たされ温度 37℃に保った水槽、デジタルカメラなどからなる。

血管軸方向を伸展方向として、-40℃で冷凍保存された標本を幅 1 mm に切り出し、線維被膜を剥がした後、つかみ具間距離 6 mm で把持した。

伸展試験前には、森田の手法を用いて、粒子状の印を試験片表面に付した<sup>3)</sup>。試験ではまずプリコンディショニングとして、ひずみ速度 1%/s、ひずみ範囲 10%、6 周期の繰返し伸展を行った。次に、同じひずみ速度で破断するまで伸展した。変位はつかみ具間距離の変化量に相当し、荷重と変位の時系列データをコンピュータに取り込んだ。また、試験片表面を連写して、粒子の移動を追跡して伸展方向ひずみの測定に用いた。

試験後、つかみ具間の伸びと端部から離れた試験片領域のひずみの関係を DippMotionPro 2D (株式会社ディテクト) で調べ、荷重-変位関係から直接得られる応力-ひずみ関係のうちのひずみ値を補正して、試験片の応力-ひずみ関係を得た。

### 3. 実験結果と考察

68 歳男性の胸大動脈の黄色プラーク領域の線維被膜の応力-ひずみ関係を Fig. 1 に示す。図の曲線は試験片が破断するか、つかみ具の把持部で明瞭な滑りが生じるまでの範囲である。ひずみが 10%から 20%程度生じる間に応力は 1MPa 以上の大きさとなっており、同年代の正常な血管壁の応力-ひずみ関係に比べて著しく硬くなっている。

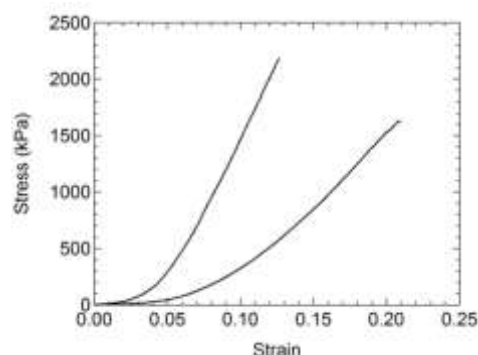


Fig. 1 Stress-strain relationships for the two specimens of fibrotic intima under uniaxial stretch (68 y.o. male).

Holzapfel らも腸骨動脈の動脈硬化部について伸展試験を行い<sup>2)</sup>、本研究と同様に著しく変形し難い性質を得ており、線維被膜の特徴と考えられる。

### 5. 結言

剖検例の大動脈プラークの線維被膜について単軸伸展試験を行い、著しく変形し難い性質を得た。

### 謝 辞

日本学術振興会学術研究助成基金助成金（基盤研究(C), 23560091）の支援を受けたことに謝意を表す。

### 文 献

- 1) Yamada, H. and Sakata, N.: Low pressure condition of a lipid core in an eccentrically developed carotid atheromatous plaque: A static finite element analysis. *J. Biorheol.*, 2012.
- 2) Holzapfel, G. A., Sommer, G., and Regitnig, P.: *J. Biomech. Eng.*, **126**, 657-665, 2004.
- 3) 森田康之, ほか4名: 日本臨床バイオメカニクス学会誌, 28, 91-97, 2007.



## 多孔薄膜カバードステントの開発 (生体外模擬実験による瘤塞栓性能の予測)

田地川勉\*, 紅林芳嘉\*\*, 西正吾\*\*\*, 中山泰秀\*\*\*\*

\*関西大学システム理工学部 機械工学科 [〒564-8680 吹田市山手町 3-3-35]

\*\*関西大学大学院 理工学研究科

\*\*\*札幌東特洲会病院 脳神経外科

\*\*\*\*国立循環器病研究センター研究所 生体医工学部 医工学材料研究室

### 1. 緒言

我々は、未破裂脳動脈瘤の新しい治療デバイスとして、多孔薄膜カバードステントを開発している。本カバードステントは、カバー薄膜に多数の微細孔をもたせることで、確実な瘤塞栓と過度の新生内膜形成による親血管の狭窄の抑制を両立している。これまで動物実験で微細孔の開孔率が 23.6%でもこれらを両立できたが、より大開口にすることで更に早期内膜化が期待できるが塞栓性能の低下が懸念される。そこで微細孔の設計最適化を目的として、多孔薄膜の孔径と開口率が瘤内流れにおよぼす影響を生体外模擬実験で調べた。

### 2. 実験方法

流体力学における力学的相似則に基づき、定常流を動脈瘤モデルに流し瘤内流れを可視化計測した。本研究では、瘤内の二次流れの影響を極力なくするため、単純化した二次元動脈瘤モデルを、アクリルを切削して作製した。親血管は一辺  $D_h=5\text{mm}$  の正方形断面とし、動脈瘤モデルのネック幅  $N=7.07\text{mm}$  一定とした上で、円型動脈瘤の赤道直径を  $D_a=7.12\sim 14\text{mm}$  と変化させて、瘤直径が塞栓性能におよぼす影響を調べた。動脈瘤モデルに設置する多孔薄膜モデルは、微細孔直径  $d$  [ $\mu\text{m}$ ]と開口率 $\tilde{A}$ [%]を変化させ、化学エッチングによって正方格子状に円型貫通孔を加工したステンレス薄板(厚さ  $30\mu\text{m}$ )を使った。なお、その他実験条件や方法は過去<sup>1)</sup>と同じであるため説明は割愛する。

### 3. 実験結果および考察

これまでの研究で、side-wall 型の動脈瘤について、親血管の流れの壁面せん断応力 $\tau_w$ が、動脈瘤ネック部や多孔薄膜開口部を介して、動脈瘤内の血液が駆動されたことから、これまでに著者らは角運動量保存則に基づきこの粘性による駆動トルク  $T_{PV}$  と瘤内血液の慣性モーメント  $I_A$  の比

$$\frac{T_{PV}}{I_A} = \frac{64N\sqrt{\tilde{A}}}{\rho\sqrt{\pi d^2 W D_a}(1+AR \cdot BF)^3} \tau_w \frac{d^2}{D_a^2}$$

が、多孔薄膜留置後の動脈瘤内の流れにとって重要なパラメータであることを示唆した<sup>1)</sup>。(W: 親血管モデル奥行き, AR:アスペクト比, BF:ボトル

ネック係数) そこで、このパラメータと各赤道面直径の動脈瘤モデルに対して、PIV による動脈瘤内流れの可視化計測結果より求めた瘤内平均せん断速度との関係を図 1 に示す。この結果から、粘性による駆動トルクと瘤内血液の慣性モーメントの比の増加と共に瘤内せん断速度も増加する傾向にあり、動脈瘤内で観察された 3 つのフローパターン毎に、近似直線の傾きが異なっていた。また、動脈瘤の大きさによって薄膜の留置効果は異なっており、同じ薄膜であれば動脈瘤が大きいほど、微細孔直径が同じであれば開口率が小さいほど、同じ開口率であれば微細孔直径が小さいほど、瘤内せん断速度が小さくなることが分かった。ここで、貝原らによる静脈血栓発症の閾値<sup>2)</sup>であるせん断速度  $1\text{s}^{-1}$  を瘤塞栓の閾値とすると、最も治療しにくいと考えられる直径  $7.12\text{mm}$  の動脈瘤でも、多孔薄膜の開口率約 40%, 孔直径  $100\mu\text{m}$  以下で、動脈瘤を確実に塞栓できることが予測された。

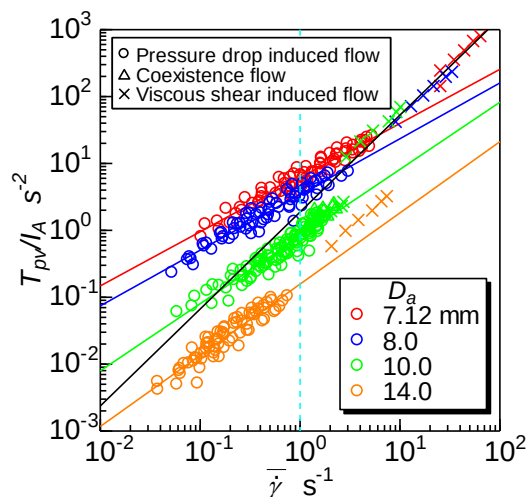


Fig. 1 Relationship between viscous shear force caused by shear flow at the parent vessel wall as the driving force of the aneurysm cavity flow and factor of embolization.

### 文 献

- 1) 田地川 他：脳動脈瘤治療用多孔薄膜カバードステントの開発，機論，印刷中。
- 2) 貝原 他：“静脈血栓発症機構に関する実験シミュレーション研究”，理研シンポジウム 生体力学シミュレーション研究 プロジェクト第一期成果報告会 予稿集，(2004)，pp. 70-80.



# 大きさの異なる液滴のマージネーションのシミュレーション

牧野真人\*, 関眞佐子\*\*

\* 山形大学大学院理工学研究科 [〒992-8510 山形県米沢市城南 4-3-16]

\*\* 関西大学システム理工学部

## 1. 緒言

血液の有形成分は、主に赤血球、白血球、血小板から構成されている。流路内に血液を流すと、中央に赤血球、壁近傍に白血球、血小板が近寄ることが知られており、これはマージネーションと呼ばれる。血小板は赤血球より小さく、白血球は赤血球より大きい、固いことが起因していると考えられている。本研究では、マージネーションのメカニズムを調べるために、大きさや表面張力が異なる 2 種類の液滴が混じっている液滴分散系の流れの 2 次元数値シミュレーションを行う。

## 2. シミュレーション方法

ニュートン流体（密度  $\rho$ 、粘度  $\eta$ ）に液滴が浮遊する系を考える。流体の速度  $\mathbf{v}$  および圧力  $p$  はナビエ・ストークス方程式

$$\rho \left( \frac{\partial \mathbf{v}}{\partial t} + \mathbf{v} \cdot \nabla \mathbf{v} \right) = -\nabla p + \nabla \cdot [\eta (\nabla \mathbf{v} + (\nabla \mathbf{v})^T)] + \mathbf{f}$$

および非圧縮条件

$$\nabla \cdot \mathbf{v} = 0$$

で記述される。ここで、 $\mathbf{f}$  は表面張力による力で、液滴の表面張力  $\sigma$ 、表面の法線ベクトル  $\mathbf{n}$  および曲率  $\kappa$  を用いて、

$$\mathbf{f} = \sigma \kappa \delta(\mathbf{r})$$

で表す。ここで  $\delta(\mathbf{r})$  はデルタ関数であり、液滴表面上でのみ値を持つ。本研究では、格子ボルツマン法により流体運動を計算し、流体の情報と液滴の表面の情報のやりとりは、フロントトラッキング法による重み関数によって計算する。

## 3. シミュレーション結果

距離  $L_y$  だけ離れた二平行平板間の流れに、大きい液滴と小さい液滴が分散した液滴分散系を考える。ここでは上下の板がそれぞれ一定の速さ  $\pm V$  で動くクエット流れに対して、無次元時間  $t(2V/L_y)=125$  におけるスナップショットの例を Fig. 1 に示す。ただし、静止状態における液滴の半径比は  $a_1/a_0=1/2$  で、液滴内外の粘度は等しく、それぞれの液滴の面積分率はともに 0.30 である。Fig.1(a)(b)(c)は、小さい液滴の表面張力係数  $\sigma_1$  は等しいが、大きい液滴の表面張力係数  $\sigma_0$  が順次大きくなっている。粘性力と表面張力の比であるキ

ャピラリー数は、変形し易さを表し、小さい液滴に対して  $Ca_1 = \eta a_1 V / \sigma_1 L_y = 1/64$  で、大きい液滴に対して、(a),(b),(c)それぞれで  $Ca_0 = \eta a_0 V / \sigma_0 L_y = 1/16, 1/64, 1/160$  である。大きい液滴が最も変形し易い(a)では、大きい液滴が内側に寄り、小さい液滴が壁近傍に寄っている。(b),(c)と大きい液滴が変形しにくくなるにつれ、大きい液滴が壁に寄っていく様子が分かる。Fig.2 は流路中心に対する液滴の平均位置の時間発展を示す。大きい液滴に対する Fig.2(a)のグラフより、キャピラリー数が大きいと流路の内側に寄り、キャピラリー数が小さいと壁に寄っていくのが分かる。(b)は小さい液滴に対するグラフで、キャピラリー数への依存性が大きい液滴の場合と逆である。特に、 $Ca_0 = Ca_1 = 1/64$  の場合は(a),(b)ともほぼ同じ位置に漸近することから、キャピラリー数が液滴のマージネーションを支配する因子になっている可能性がある。

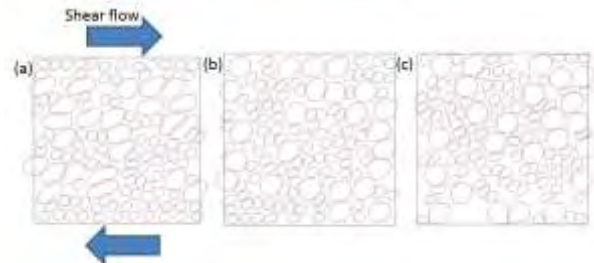


Fig.1 Snapshots of droplet dispersions in Couette flow.  $Ca_1=1/64$  and  $Ca_0= 1/16$  (a),  $1/64$  (b),  $1/160$  (c).

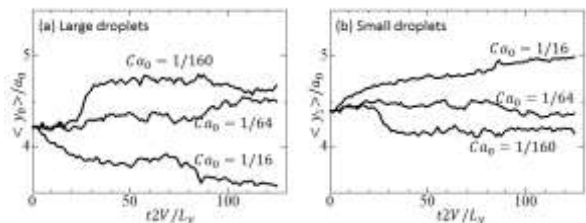


Fig.2 Mean lateral positions of large (a) and small (b) droplets from the channel center as function of time.

## 4. 結言

クエット流において、変形のしやすさがマージネーションを左右していることが分かった。血流ではポワズイユ流のようにずり速度の空間の変化があるため、今後は、ポワズイユ流における検討も行いたい。

## 円管内流れ中の粒子の分布

名村和平, 三浦和真, 板野智昭, 関眞佐子

関西大学システム理工学部物理・応用物理学科 [〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-3 5]

### 1. 緒言

管路内の流れに様々な種類の粒子が浮遊しているとき、各粒子が主流に対して垂直方向に移動して、粒子の大きさ、形状、物性等に依存して流路断面内のそれぞれ特定の位置に集まる現象について最近多くの研究がなされ、血球の分離などに利用されている。円管内ポワズイユ流れに浮遊する球形粒子に対しては、レイノルズ数が小さい場合、円管中心軸から約  $0.6R$  ( $R$  は円管半径)の動径位置に集まる現象、いわゆる Segre-Silberberg 効果が古くから知られている<sup>1)</sup>。本研究は、この現象をレイノルズ数が大きい場合にまで拡張して調べことを目的とし、レイノルズ数や粒子径を変化させた場合に、粒子が最も集まる動径位置およびそこに集まる粒子の割合を調べたので報告する。

### 2. 実験方法

浮遊粒子と比重を合わせたグリセリン水溶液を、水位差によって円管（直径  $D = 7.78\text{mm}$ 、長さ  $2\text{m}$ ）内に流す。ポリスチレン粒子（直径  $d = 500 \sim 1000\mu\text{m}$ 、比重  $1.05$ ）を上流から管内に流し入れ、管入口から  $1.95\text{m}$  の断面に照射したレーザーシートを光源として下流からデジタルカメラにより  $300\text{fps}$  で撮影する。撮影した画像を画像処理ソフト ImageJ により解析し、各粒子の管断面内における座標を求める。レイノルズ数を  $Re = \rho U D / \eta$ （ただし、 $\rho$ ：溶液の密度、 $\eta$ ：粘度、 $U$ ：平均流速）と定義し、 $Re = 100 \sim 1000$  の範囲で実験を行った。

### 3. 結果と考察

実験結果の一例として、 $d = 650\mu\text{m}$  ( $D/d = 12$ )、 $Re = 561$  の場合に得られた、管断面内における粒子分布を Fig. 1(a)に示す。この図の各点が粒子の中心位置である。Fig. 1(a)の結果を粒子の動径方向分布として Fig. 1(b)にまとめた。この図に示すように粒子分布は一般に2つの山をもつことが分かった。動径位置によりそれぞれ“内側の山”、“外側の山”と呼ぶことにし、最大値をとる動径位置を円管の半径  $R (= D/2)$  で規格化して、 $Peak_I$ 、 $Peak_O$  と表す(Fig.1(b))。

Fig. 2 は、 $D/d = 7.8, 12, 15$  に対する  $Peak_I$  と  $Peak_O$  をレイノルズ数  $Re$  の関数として描いたものである。 $Peak_O$  は  $Re$  が減少して 0 に近づくと  $0.6R$  (Segre-

Silberberg 効果)に漸近し、逆に  $Re$  が増加すると管壁に近づくことが分かる。この傾向は、Fig. 2 に示した先行研究の結果<sup>1-3)</sup>とも一致している。また、先行研究の結果<sup>1)</sup>と異なり  $Peak_I$  が存在し、その位置は  $Re$  の増加とともに管中心に近寄っていくことが新たに示された。

粒子分布の2つの山に含まれる粒子数の割合を調べると、“外側の山”に含まれる粒子の割合は  $Re$  の増加と共に減少し、一方“内側の山”に含まれる粒子の割合は増加することが示された。

### 4. 結言

円管内の球形粒子の分布について、従来から知られている Segre-Silberberg 効果(“外側の山”)は、 $Re$  の増加に伴って管壁に近づき、その粒子数の割合は減少する。“内側の山”が存在し、 $Re$  の増加に伴って管中心に近づき、その粒子数の割合は増大する。

### 文 献

- 1) Segre, G., Silberberg, A.: *J. Fluid Mech.* 14, 136-157, 1962.
- 2) Matas J-P. et al.: *J. Fluid Mech.* 515, 171-195, 2004.
- 3) Shao, X. et al.: *Phys. Fluids* 20, 103307, 2008.

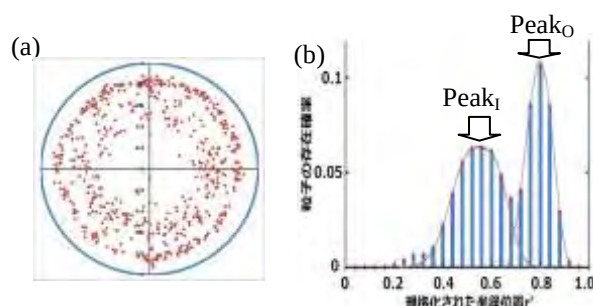


Fig. 1 (a) Particel distribution over a circular cross-section and (b) the corresponding histogram showing the probability, for  $Re = 561$  and  $D/d = 12$ .

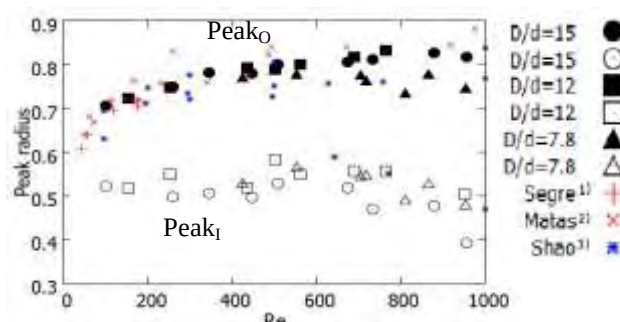


Fig. 2 Equilibrium radial positions of spherical particles suspended in the Poiseuille flow (Closed symbols:  $Peak_O$ , open symbols:  $Peak_I$ ).

## マイクロチャンネル法によるヒト赤血球変形能の定量評価 (形状回復時定数に対する糖尿病指標の影響)

能田 卓弥<sup>\*</sup>、久保田 麻紀<sup>\*</sup>、田地川 勉<sup>\*\*</sup>、池本 敏行<sup>\*\*\*</sup>、田窪 孝行<sup>\*\*\*\*</sup>

<sup>\*</sup>関西大学大学院, 大阪府吹田市山手町 3-3-35

<sup>\*\*</sup>関西大学システム理工学部, 大阪府吹田市山手町 3-3-35

<sup>\*\*\*</sup>大阪医科大学付属病院 中央検査部, 大阪府高槻市大学町 2-7

<sup>\*\*\*\*</sup>大阪医科大学 臨床検査医学, 大阪府高槻市大学町 2-7

### 1. 緒言

糖尿病は長期にわたると、赤血球の糖化によって赤血球変形能が低下すると報告されている<sup>1)</sup>が、そのメカニズムには不明な点が多く、またこれを評価する方法の確立が望まれている。そこで本研究では、糖尿病指標である血糖値とHbA1cの異なる症例の赤血球について形状回復時定数を測定し、糖尿病が赤血球変形能に及ぼす影響を調べた。

### 2. 血球サンプル

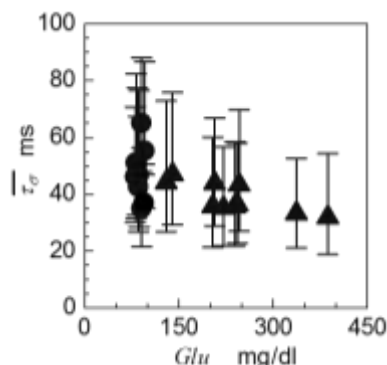
健常者 9 例、血糖値および HbA1c が高値の 11 例から採血した。赤血球を PBS で Hct=1% に希釈して血液サンプルとして用いた。なお、本研究は関西大学先端技術機構の研究倫理委員会および大阪医科大学の倫理委員会の承認を得て実施した。各指標の基準範囲は、血糖値が 60~90 mg/dl、HbA1c が 4.6%~6.2% である。なお、これら基準範囲は大阪医科大学付属病院中央検査部の規定に準ずる。

### 3. 実験装置・方法

マイクロチャンネル(MC)をガラスに接着させ、漏れのない流路を形成した。血球サンプルをMCに通過させ、通過後の形状回復過程を撮影した。赤血球幅 $d_y$ を、MCから赤血球が出た直後を $t=0$  msとし、2 ms 間隔 $t=300$  ms( $d_y=d_{y0}$ )まで測定した<sup>2)</sup>。

MC通過後の赤血球の形状回復過程を粘弾性力学モデルであるKelvinモデル<sup>3)</sup>でモデル化した。赤血球の圧縮ひずみは式(1)に示す時定数を緩和時間として指数関数的に減少する。

$$\tau_\sigma = \mu_2 \left( \frac{1}{k_1} + \frac{1}{k_2} \right) \quad (1)$$



### 4. 実験結果

#### 4.1 時定数の算出

片対数グラフ上のひずみ緩和曲線に対して描いた近似直線の傾きから時定数 $\tau_\sigma$ を算出した<sup>2)</sup>。

#### 4.2 時定数の算出

血糖値およびHbA1cと時定数の幾何平均値の関係を図1に示す。プロットは幾何平均値、エラーバーは式(2)で定義した標準偏差相当値 $\sigma$ である。

$$\sigma = \overline{\tau_\sigma} \exp(\pm \sigma_{\ln}) - \overline{\tau_\sigma} \quad (2)$$

なお $\sigma_{\ln}$ は自然対数をとった時定数標準偏差である。

これらより、時定数の平均値は血糖値およびHbA1cの増加に伴い短縮する傾向がみられた。

健常者9例の時定数の幾何平均値は49 ms、糖尿病患者11例の幾何平均値は39 msとなり、検定の結果、幾何平均値の間には $p<0.05$ で有意差が認められた。

### 5. まとめ

糖尿病指標が赤血球変形能に及ぼす影響を調べるため、MCを用いて赤血球の時定数を測定した結果、糖尿病指標の増加に伴い形状回復時定数は短縮した。健常者と糖尿病患者の幾何平均値には、有意差が認められた。以上の結果から、本指標によって変形能の低下を検出できる可能性がある。

### 6. 参考文献

- (1) 丹家: 日老医誌, 17(5), pp. 542-546, (1980).
- (2) Tajikawa T., et.al.: J Biorheol., DOI: 10.1007/s12573-012-52-9, Aug 4 2012.
- (3) Fung YC.: Biomechanics -Mechanical Properties of Living Tissue-, Springer-Verlag, (1993).

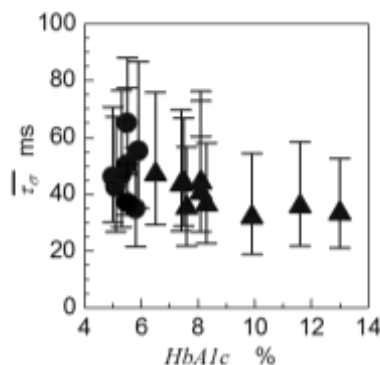


Fig. 1 Influences of HbA1c and blood glucose level on time constant of shape recovery.

## マイクロチャネル内流れ中の血小板模擬粒子の運動

○田中慎之介，関淳二，板野智昭，関眞佐子

関西大学大学院 物理・応用物理学分野 [〒564-8680 大阪府吹田市山手町 3-3-35]

### 1. はじめに

血液は，赤血球を高濃度で含むサスペンションであり，有形成分として他に血小板と白血球を含んでいる．生体の血管内血液流れにおいて，赤血球は血管中心軸に近寄る傾向があるのに対し，血小板は血管壁付近で密度が高い(Near Wall Excess; NWE)ことが知られている．血小板は損傷を受けた血管壁を修復する役割を担っているので，血小板の NWE はその役割を果たすのに極めて有効である．本研究は，血小板の NWE のメカニズムを明らかにするために，模擬血小板として蛍光粒子を混入させた赤血球サスペンションを人工流路に流し，流路入り口からの各流路断面における蛍光粒子分布を調べたので報告する．

### 2. 実験方法

模擬血液として，デキストラン 40 (5w%) と牛血清アルブミン (1w%) をリン酸緩衝生理食塩水へ添加したものに，ヒト赤血球と蛍光粒子 (直径  $3\ \mu\text{m}$ ) を分散させ，PDMS 製のマイクロチャネル ( $50\ \mu\text{m}$  の正方形断面) に流した．共焦点顕微鏡－高速度カメラシステム(Fig. 1)により得られた蛍光画像を画像処理ソフト ImageJ により解析して，蛍光粒子の位置を求めた．具体的には，流路幅の方向(y 方向)を  $2\ \mu\text{m}$  幅に分割し，各画像でそれぞれの区間に含まれる粒子数を積算することで蛍光粒子の個数分布を得た(Fig. 2)．流路入口の中央を原点として流れ方向に x 軸をとり，5mm 間隔で設定した A～E の 5 点で計測を行った(Fig. 3)．

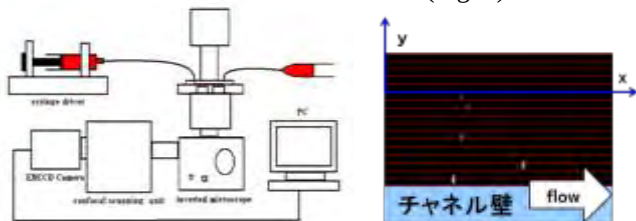


Fig. 1 Experimental setup.

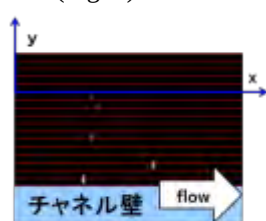


Fig. 2 Example of images.

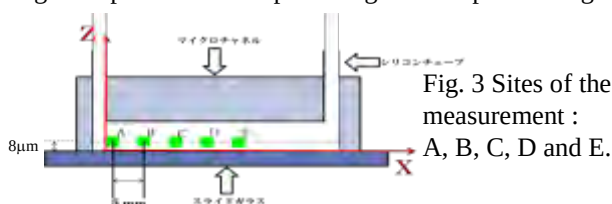


Fig. 3 Sites of the measurement : A, B, C, D and E.

### 3. 実験結果と考察

Fig. 4 に，流路底面から  $8\ \mu\text{m}$  の断面における，A( $x=0$ ), C( $x=10\text{mm}$ ), E( $x=20\text{mm}$ )の粒子分布を示す．ただし，縦軸は規格化した粒子密度を示し，Fig. 4(a)は赤血球体積分率(Hct)が 20% の場合，(b)が 44% の場合である．流量は  $1.0\ \mu\text{L}/\text{min}$  である．

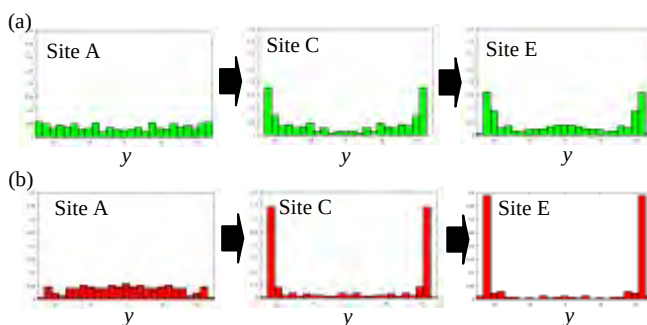


Fig. 4 Variations of particle density distributions from upstream to downstream (a) Hct=20%, (b) Hct=44%.

Fig. 4(a), (b)より，計測位置 A では，Hct=20% の場合も 44% の場合も，血小板模擬粒子は流路幅方向にほぼ一様に分布していることが分かる．いずれの場合も，C, E と下流に進むにつれ，粒子は壁面近傍に多く分布するようになるが，(b)の Hct = 44% の方がその傾向が顕著にあらわれた．下流における流路壁近傍の粒子密度は，Hct=44% の場合の値は 20% の場合の 2 倍程度となっている．また，いずれの場合も C と E での分布がほぼ等しいので，入口から 10mm 程度の距離で最終分布に近づいていることが分かる．ただし，Hct= 44% の場合には，計測位置 B( $x=5\text{mm}$ )の分布も C の分布にかなり近いことから，Hct が高い方が最終分布に達する距離が短いことも示された．これらの結果から，血小板模擬粒子の分布は，赤血球の影響を強く受けていることが分かる．

### 4. まとめ

赤血球サスペンション流れにおける蛍光粒子の流路内分布の計測から次の結果が得られた．

- ① 粒子は，下流に進むにつれて壁面近傍に多く分布した．
- ② Hct が高い方が，壁面近傍に分布する割合が大きく，短い距離で最終分布に近づいた．



## 赤血球集合に与える赤血球表面糖鎖の影響

外山 吉治, 須田 巧, 窪田 健二

群馬大学理工学研究院 [〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1]

### 緒言

ヒトやウマなど多くの哺乳類の赤血球は、血漿中で連銭と呼ばれる集合体を形成する。連銭の形成メカニズムについては、赤血球間をフィブリノゲンなどの高分子が架橋する「架橋集合」と高分子が赤血球表面から排除されることによって生じる浸透圧勾配による「枯渇集合」の2説があり、現在でも解決されていない。一方、同じ哺乳類でもウシ赤血球は血漿中で連銭を形成しない。しかし、ウシ赤血球にトリプシン処理を施すと連銭が形成されることが報告されている<sup>1)</sup>。この原因の一つとして、赤血球表面に存在するシアル酸の負電荷による静電反発力の影響が考えられるが、ノイラミニダーゼ処理によってシアル酸を除去しても連銭を形成しないことが同報告に示されている。

これまでに我々は、トリプシン処理したウシ赤血球とフィブリノゲンとの相互作用を水晶振動子マイクロバランス (QCM) 法によって測定した (図 1)。その結果、トリプシン処理によりわずかにフィブリノゲンとの相互作用の増大が見られたが、連銭形成の有無を左右するほどの差であるかどうかは不明である。本研究では、赤血球表面の糖鎖末端のシアル酸の負電荷だけでなく、糖鎖全体の立体障害に着目し、グリコシダーゼを用いて糖鎖そのものを切除して赤血球集合への影響を調べた。

### 実験および結果

試料は、ウシ赤血球 (日本バイオテスト研究所)、フィブリノゲン (From Bovine, Sigma)、N-グリコシダーゼ (PNGaseF, Biolabs)、O-グリコシダーゼ (O-Glycosidase, Biolabs)、PBS (139.6 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) を用いた。ウシ赤血球の PBS 懸濁液に N-グリコシダーゼ (160U/ml) および O-グリコシダーゼ (16,000 U/ml) を加え 37 °C で 24 時間インキュベートすることにより、膜たんぱく質に結合している N-および O-結合糖鎖を切除した。酵素処理した赤血球を 3mg/ml のフィブリノゲンを含む PBS に Ht 1% で懸濁させ、連銭形成の有無を顕微鏡によって観察した。さらに、Ht 25% の懸濁液を調製し、赤血球沈降曲線の測定を行った。

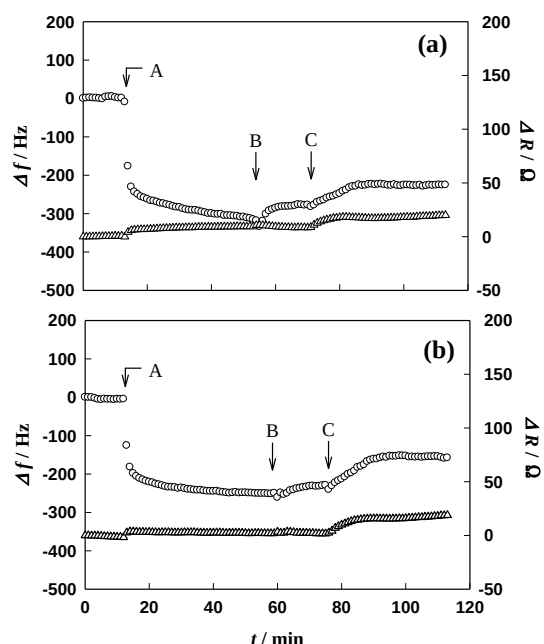


図 1 トリプシン処理を施したウシ赤血球とフィブリノゲンとの QCM 測定 (a) トリプシン未処理の赤血球, (b) トリプシン処理した赤血球, 矢印 A: 振動子表面へのフィブリノゲンの固定化, B: 非特異的に吸着したフィブリノゲンを洗浄除去, C: 赤血球の添加

これまでのところ、糖鎖切除による赤血球集合および沈降曲線に有意な差は認められなかった。今後、再現性を確かめるとともに、酵素濃度を変えた実験や QCM を用いた赤血球表面-フィブリノゲン相互作用の測定を行う予定である。

### 謝 辞

本研究の一部は文部科学省科学研究費助成事業 (No23550237, 24550245) の助成により行われた。

### 文 献

- 1) Kaibara, M.: Rheological behaviors of bovine blood forming artificial rouleaux. *Biorheology*, 20, 583-592, 1983.

## 非接触レーザー血流計による生体顕微鏡下での実質臓器微小血管血流計測

林浩大\*, 柴田政廣\*

\* 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 [〒337-8570 埼玉県さいたま市見沼区深作 307]

## 1. はじめに

臨床における血流モニターとしてレーザー血流計が用いられている。本装置は経皮的にレーザー光を照射し、赤血球の流れによる反射光のスペククル変化から血流変化を非侵襲的に連続計測する。一方、微小血管血流の直接観察法として、生体顕微鏡法があるが、血流観察と同時に実時間で血流量を求めることは困難である。そこで、本研究は生体顕微鏡にレーザー血流計を組み込むことにより、微小循環動態を直視下にし、任意の微小血管血流を実時間計測可能な *in vivo* 微小血管血流モニターの開発を行った。

## 2. 方法

生体顕微鏡への組み込みと非接触での計測を可能にするため、レーザー血流計のプロープの発光部と受光部を分離した。発光部は対物レンズ脇に設置し、測定対象血管へ直接レーザー光を照射した。また、受光部は生体顕微鏡のカメラ鏡筒の結像面に設置し、対象血管からの反射光のスペククル変化を、対物レンズを介して連続的に計測した。微小循環動態とレーザー照射部位は拡大倍率  $\times 50 \sim \times 500$  の 20 インチモニター上で確認できるため、モニター上で任意の微小血管を選択し、血流測定が可能である。

実験は、本法の測定精度の検討のためのモデル実験と、生体（多種類の臓器の微小血管血流）への有用性を検討するための動物実験を行った。モデル実験では、既知流量とレーザー血流計出力信号（血流速度）の相関性を検討した。内径 1mm のガラス毛細管を用い、流量を 0.1~0.18ml/s の範囲で変化させ実験を行った。流量とレーザー血流計出力信号（血流速度）の相関関係を検討すると同時に、レーザー発光部の照射角（ $60^\circ$ 、 $45^\circ$ 、 $30^\circ$ ）、測定部までの距離（150mm、100mm）、対象血液のヘマトクリット値（30%、20%、10%）を変え、これらによる測定精度の検討も行った。動物実験では、ラット挙辜筋内細動脈と腎微小血管を対象にした。本装置を用いて血流速度を計測し、途中、血流を制御することで、血流変化に対するレーザー血流計出力信号（血流速度）の変化を連続的に記録した。

## 3. 結果

モデル実験では、縦軸をレーザー血流計出力信号（血流速度）、横軸を既知流量とし、これらの相関性を検討した。その際、各最大値を 100% として、相対値で示した。結果、これらは良好な直線関係を有し、発光部の照射角、距離、対象血液のヘマトクリット値の違いによる測定精度への影響には有意な差は認められなかった。

動物実験の結果を Fig.1 と Fig.2 に示す。Figure 1 はラット挙辜筋内の単一細動脈（直径約  $88\mu\text{m}$ ）を対象にした測定結果である。実験は顕微鏡倍率  $\times 500$  で行った。測定開始 60 秒後、血管収縮剤投与により血管径は約 43% 収縮し、その時の血流低下を良好に検出した結果となった。Figure 2 はラットの腎微小血管を対象にした測定結果である。測定開始 60 秒後と 120 秒後、腎動静脈を結紮し、その加減によって血流に変化を付けた。結果、加減に合わせて血流低下を良好に検出した。

## 4. まとめ

モデル実験、動物実験より、本法の微小血管血流の測定方法として有用性が確認された。今後は 3 次元微小血管構築を有する実質臓器による適応性の検討、主に測定深度の検討を行う。

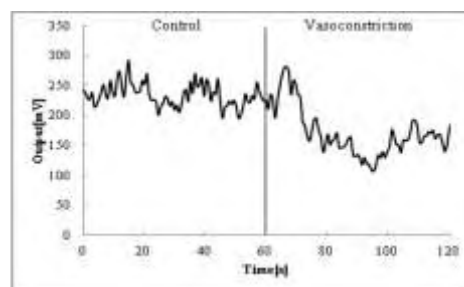


Fig.1 Relative changes of microvascular blood flow after application of vasoconstrictor

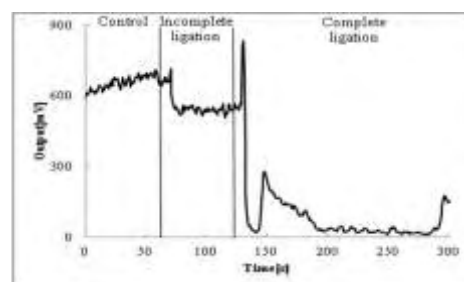


Fig.2 Relative changes of microvascular blood flow under restricted flow conditions incomplete and complete ligation



# マクロおよびマイクロ血液循環解析手法による ポアズイユの法則の実験的検証

横川和弘\*, 柴田政廣\*

\* 芝浦工業大学大学院 理工学研究科 [〒337-0003 さいたまし見沼区大字深作 307]

## 1. 緒言

流体力学の主要な法則としてポアズイユの法則がある。この法則は円柱管内を流れる流量、圧、抵抗の関係を表したもので、流量(抵抗)は圧に比例し、比例定数である抵抗は管径の 4 乗に反比例するというものである。本研究では細動脈血管径と動脈血圧測定を同時計測することにより非ニュートン流体である血液が流れる *in vivo* 血液循環における本法則の妥当性の検証を試みた。

## 2. 実験方法

実験には、麻酔下ラット(♂, 6–20 wks, 180–540g.b.w.)11 匹を用いた。血圧計測は頸動脈挿管カテーテルにより、また細動脈微小循環の観察は生体顕微鏡法により cremaster 筋を対象に同時に行った。血管径の変化は NOS 産生阻害剤 L-NAME を全身投与することにより行い、その投与前後の細動脈血管径と血圧を測定し、

$$\Delta R_{micro} = \frac{1/r_{LNA}^4 - 1/r_{cont}^4}{1/r_{cont}^4} \times 100 \quad (1)$$

$$\Delta R_{macro} = \frac{\Delta P}{CO} = \frac{P_{LNA} - P_{cont}}{P_{cont}} \times 100 \quad (2)$$

$p_{cont}$  : 阻害前血圧  $p_{LNA}$  : 阻害後血圧  
 $r_{cont}$  : 阻害前血管径  $r_{LNA}$  : 阻害後血管径  
 CO : 心拍出量(constant)

によりマイクロレベル( $\Delta R_{micro}$ )およびマクロレベル( $\Delta R_{macro}$ )での血管抵抗変化率を求め、それらを比較した。

## 3. 実験結果

図 1 に通常時と NOS 産生阻害時の血圧変化(平常時:  $91 \pm 8$  mmHg, 阻害時:  $114 \pm 9$  mmHg)と同時に計測した細動脈径の変化を示す。NOS 産生阻害時には細動脈が収縮し血圧が上昇していることがわかる。本結果を基に(1)(2)式を用い  $\Delta R_{micro}$  および  $\Delta R_{macro}$  を求めた。このとき心拍出量は阻害剤投与前後で一定であると仮定した。図 2 にその結果を示す。両者間には良好な直線関係が得られ、ポアズイユの法則が *in vivo* 微小血管系において成り立つことが明らかになった。

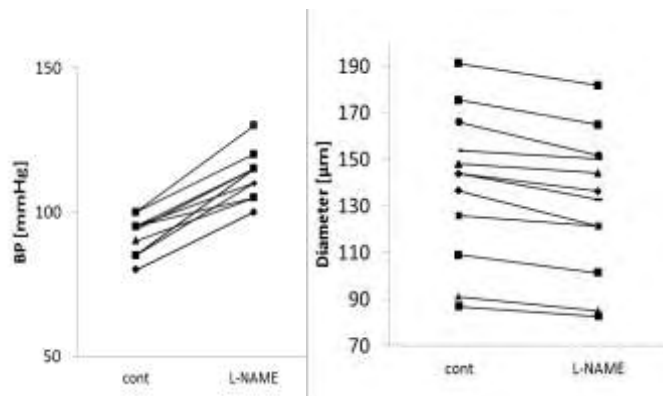


Fig.1 Change in blood pressure and arteriolar diameter before and after NO inhibition

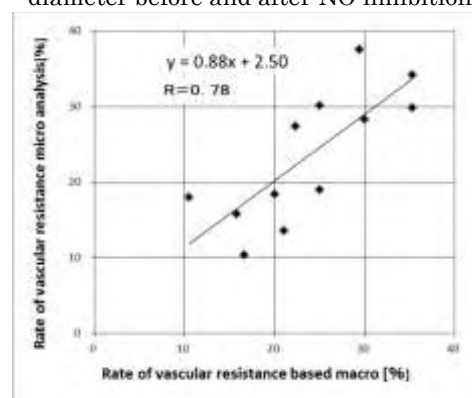


Fig.2 Relationship between the micro and macro vascular resistance

## 4. 結言

生体顕微鏡法と頸動脈挿管カテーテルによる直接血圧測定法を用いた同時計測システムを開発し、NOS 産生阻害剤の全身投与時における血圧変化(マクロ)と細動脈血管径(マイクロ)から求めた血管抵抗変化率を比較した。その結果、両者には良好な相関が見られ円柱管を対象としたポアズイユの法則が *in vivo* 微小血管にも通用することが実証することができた。一方で、今回の研究では NOS 産生阻害剤投与前後で心拍出量は変化しないとの仮定の基で検証を行った。NO を介した血管調節は主に末梢血管により行われると考えられるが、今後心拍出量の実測を行う予定である。

## 骨格筋微小循環における酸素ダイナミクス

柴田 政廣, 濱島 早紀, 川村 彩智

芝浦工業大学生命科学科 [〒337-8570 さいたま市見沼区深作 3 0 7]

Krogh の研究以来、生命活動を維持する上で最も重要な物質である酸素は、拡散により毛細血管から組織へ供給されると信じられている。よって生理的状态にある骨格筋組織の毛細血管分布は、酸素拡散に関する物理的特性により支配されるため、体重 30g のマウスも 5000kg のゾウもほぼ同等の幾何学的特徴を有している。しかし、最近の我々の研究では、毛細血管の前に位置する細動脈においても既に血中酸素濃度は低下しており、かつ細動脈壁で大きな酸素濃度勾配が存在することが明らかになってきた。これらの結果は、毛細血管のみが唯一酸素供給の場ではなく、細動脈も組織への酸素供給源として機能している可能性を示唆するものである。しかし、この細動脈での血中酸素濃度の低下を、組織への酸素拡散のみで説明しようとする、細動脈血管壁内での酸素拡散係数が自由拡散係数よりも大きくなるという物理的矛盾が生じる。一方、細動脈は、収縮拡張を繰り返し組織への血流調節と全身の血圧調節のため常に仕事を行っている。特に運動時には安静時の 20 倍以上の血流増加を可能とする骨格筋細動脈の仕事量の多さは容易に想像できる。我々は、細動脈レベルでの血中酸素濃度の低下に、組織への酸素供給に加え、この細動脈の仕事に費やす血管壁の酸素消費が強く影響しているのではないかと考えている。そこで血管壁での酸素消費を定量化するため、酸素感受性色素のリン光寿命を顕微鏡下で光学的に測定するシステムを開発し、ラットの骨格筋細動脈レベルでの酸素分圧を実測した。得られた血管内外での酸素分圧のデータを基に、細動脈血管壁での酸素消費率を理論的に求め、酸素濃度勾配形成と細動脈血管壁での仕事量の関連を検討した。

図 1 に骨格筋細動脈での血中酸素分圧の測定結果を示す。測定は、同一筋組織の上流側に位置する直径 100 $\mu$ m 程度の細動脈およびその下流に位置する細動脈（直径 80 $\mu$ m, 60 $\mu$ m）を対象に、生理的状态と拡張剤局所投与時で行った。細動脈での血中酸素分圧は、上流側でも既に動脈より低く、中流、下流と更に低下している。血管内外の酸素分圧勾配より求めた細動脈血管壁での酸素消費率は、下流側より上流側で、さらには血管拡張時（血管平滑筋弛緩時）より通

常時の方が高値を示し（図 2）、血管平滑筋の仕事量に依存すると考えられる。また得られた値は、これまでの *in vitro* 実験系による報告値より遙かに大きく、細動脈での酸素濃度勾配の形成に強く関与していることがわかる。さらに通常時の細動脈血管壁の酸素消費率は、骨格筋組織の酸素消費率に比べ 500 倍以上高く、安静時の全骨格筋が消費する酸素量と同等の酸素を、容積的にはごく僅かな（約 0.7%）細動脈血管壁が消費していることになる。これは、安静時の骨格筋では、筋への流入血流量を制限するため細動脈自身が酸素を消費して仕事を行い、少ない全身血流量で他臓器の血流を確保している一方、運動時には、細動脈平滑筋が弛緩して仕事量（酸素消費）を減らすことにより、結果として酸素需要の高い骨格筋組織へ効率的な酸素供給を行うという極めて合目的な血流調節機構の存在が示唆される。

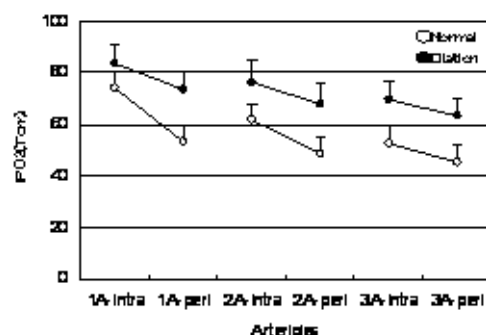


Fig.1 The intra- and peri-vascular  $PO_2$  of 1A, 2A and 3A arterioles under normal conditions and during papaverine-induced vasodilation

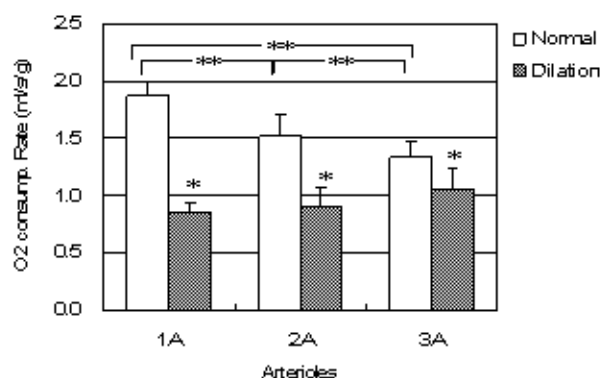


Fig.2 The oxygen consumption rates of arteriolar walls under normal conditions and during vasodilation

## 高イオン強度下でのフィブリン凝集に対する糖鎖切除効果

窪田 健二\*, 外山 吉治\*, 行木 信一\*, 落合 正則\*\*

\* 群馬大学理工学研究院 [〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1-5-1]

\*\* 北海道大学低温科学研究所

### 1. 緒言

フィブリノゲンは血液凝固カスケードの最終段階で働く重要な糖タンパクである。フィブリン凝集は、フィブリノゲンが酵素トロンビンにより生成したフィブリンモノマーが軸方向に半分子長つつずれて凝集したプロトフィブリル(PF)の生成・成長過程とこの PF がラテラル方向に凝集しネットワークを形成するラテラル凝集過程の 2 段階で進行する。フィブリノゲンの  $\beta$  鎖と  $\gamma$  鎖には複合型の糖鎖が N 結合しており、これが切除されると顕著なフィブリン凝集の促進が起こることが知られている。

一方、フィブリン凝集は塩濃度 (NaCl 濃度) の変化にも敏感に影響を受け、高い [NaCl] では顕著な凝集の遅延が起こる。これには  $\text{Cl}^-$  イオンが主導的に作用しているとされている。糖鎖の末端には電荷を持つシアル酸がついているので、糖鎖切除による凝集促進効果が糖鎖の静電相互作用が関係するものであれば、高 [NaCl] 条件でその効果が減殺されると予想される。この点に着目し、糖鎖がフィブリン凝集で果たす役割を解明していくことを目的として、今回の研究を進めた。

### 2. 実験方法

試料のフィブリノゲンはシグマから購入した Bovine Fibrinogen (type IV) である。TBS で透析処理し、糖鎖の切除には N 結合糖鎖を根元から切断する PNGF と糖鎖の非還元末端のシアル酸のみを切除するノイラミニダーゼを用いて糖鎖切除フィブリン (DG-fibrinogen, asialfibrinogen) を調製した。試料溶液は、20 mM Tris/HCl、0.15 M ならびに 0.225 M の NaCl 濃度の溶液 (1 mM の  $\text{CaCl}_2$  を含む) にフィブリノゲン濃度が 1 mg/mL になるように調製し、トロンビンならびにレプチラーゼをフィブリン 1 mg に対しそれぞれ 10 mU, 5 ng になるように添加し、凝集反応を開始させた。フィブリン凝集過程は、波長 350 nm での濁度測定により OD 値の経時変化を測定することで行った。

### 3. 実験結果

PNGF 処理の場合、SDS-PAGE の結果からフィブリノゲン  $\beta$  鎖に結合している糖鎖は完全に、 $\gamma$  鎖に結合しているものは 10% 以下の切除であった。

また、ノイラミニダーゼ処理ではシアル酸は完全に切除された。

インタクトのフィブリノゲンの場合、0.225 M NaCl の条件では、顕著な凝集の抑制が見られた。PNGF 処理による DG-fibrinogen の場合、図に示すように生理的条件の場合と同様に顕著な凝集の促進が起こる。単にラグタイムが減少するだけではなく、0.15 M NaCl と同程度の速度でラテラル凝集が進行した。この特徴は、シアル酸のみを切除したもの、レプチラーゼを用いた場合でも同様のものであった。

time course of thrombin-catalyzed fibrin polymerization

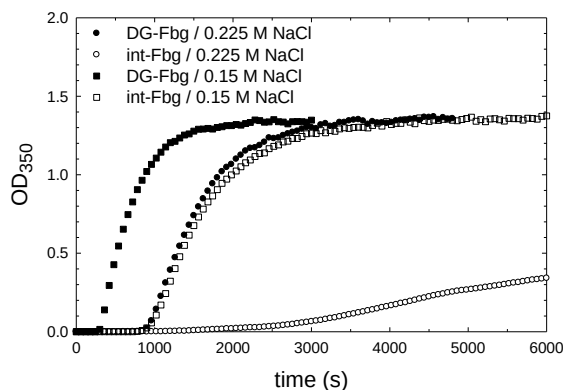


Fig. 1. Time course of thrombin-catalyzed fibrin polymerization of DG-fibrinogen and intact one at NaCl concentration of 0.15 and 0.225 M.

### 4. 考察

糖鎖はラテラル凝集への移行を抑制するが、その作用が静電的なものであれば、高 [NaCl] では抑制効果は弱くなるので、インタクトの場合でも凝集の抑制は起こらないはずである。また、糖鎖切除による促進効果も弱くなる。結果はその逆であり、糖鎖の作用は静電的なものではないことを示している。末端シアル酸のみの切除でも同様の効果が見られることを考えると、糖鎖の構造 (シアル酸) に対するある程度特異的な相互作用によりラテラル凝集への移行の抑制 (調節) がなされていることが示唆される。

### 謝 辞

本研究は科研費 (24550245, 23550237) の助成を受けて行われた。

## DYNAMIC SHEAR RESPONSES OF POLYMER-POLYMER INTERFACES

名嘉山 祥也, 梶原 稔尚

九州大学大学院工学研究院 化学工学部門 [〒819-0395 福岡市西区元岡 744 番地]

エマルションや非相溶ポリマーブレンドなどの複合材料の物性は、成分の物性のみでなく、界面の性質に依存する。複合材料のモルフォロジーとレオロジーの関係の研究は多いが、比べて界面のレオロジーについての研究は限られている。ところで、表面、いわゆる気液界面あるいは気固界面の力学物性の研究は近年研究がさかんである。これは、AFM などの SPM を用いた評価技術の開拓や、従来からある surface shear rheometry の方法によるところが大きい。これらの測定では、プローブを直接表面にアクセスする必要がある。したがって高分子間界面などのように材料にプローブを侵入させることが難しい系には適用できない。高分子間界面の動的な物性を調べるには従来とは別の方法が必要である。

非相溶高分子同士が界面を形成すると、自由エネルギーで決まる平衡界面厚さに高分子鎖が相互拡散する。つまり高分子間界面は、薄いが有限の厚さをもつ。平衡界面内の高分子鎖はバルクと異なる状態にあり、また長い高分子鎖は界面領域とバルク領域にまたがった状態を取りえる。このような内部構造によって、界面層にはバルクと異なる緩和過程があるだろう。

本研究では、熔融高分子間界面の動的応答を測定する方法を提案する。この方法を用いて、polypropylene, polystyrene と分子量分布および分子構造の異なる polyethylene の界面の動的応答を測定した。

有限厚さの界面のせん断変形を考えると、界面の応答は定性的に 2 通り考えられる。バルクよりも大変形する場合(スリップ)と (Fig.1(a)), バルクよりも小さな変形をする場合である (Fig.1(b)). このような積層系のレオロジーへの界面の寄与を特徴づけるために、界面の寄与を表す長さスケールを用いて非粘着長さを導入した。高分子間メルト界面の非粘着長さを Fig.2 に示す。3 つの polyethylenes の Mw は近いが、分子量分布と分岐構造が異なる。測定結果は、分子構造によって界面の応答が異なることを示唆している。すなわち界面の動的応答は平衡物性では決まらない性質に強く依存している。

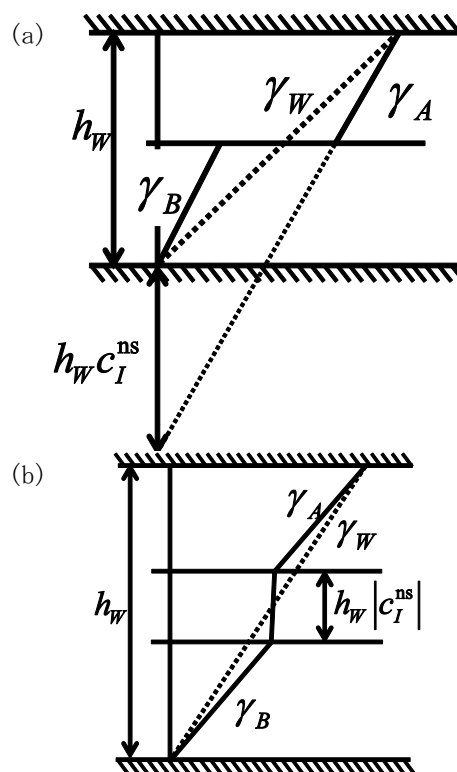


Fig. 1: Schematic illustrations of displacement in a interface (a) for a positive non-stick length,  $h_I^{ns} > 0$ , (b) for a negative non-stick length,  $h_I^{ns} < 0$ .

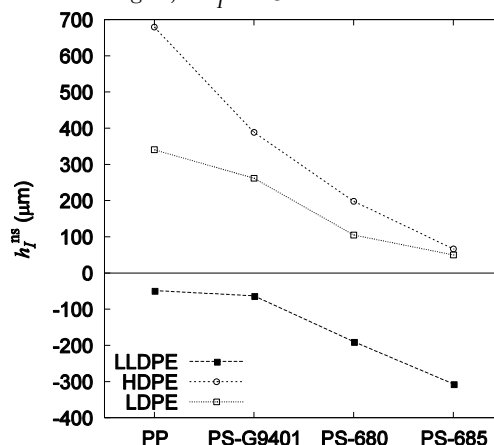


Fig. 2: Non-stick length of interfaces.

## 文 献

- 1) Nakayama, Y., Kataoka, K. and Kajiwar, T.: Dynamic shear responses of polymer-polymer interfaces. Nihon Reorogi Gakkaishi, **40**, 245-252, 2012.

## 血管内皮細胞内 PKC $\alpha$ の局在変化におよぼす 局所引張の影響

隅井干城\*, 木村恭彰\*\*, 島田知弥\*\*, 土屋宏紀\*\*, 工藤奨\*\*\*

\*九州大学大学院 工学府 機械工学専攻 [〒819-0395 福岡県福岡市西区元岡 744]

\*\*芝浦工業大学大学院 理工学研究科 機械工学専攻 [〒135-8548 東京都江東区豊洲 3-7-5]

\*\*\*九州大学大学院 工学研究院 機械工学部門

### 1. 緒言

血管内皮細胞は血管内壁が創傷した際、創傷領域に集団で移動し創傷箇所を修復する事が知られている。集団移動により傷を修復するためには細胞間及び細胞内へ情報を伝達し移動する機構が必要であり、Protein Kinase C  $\alpha$ (PKC $\alpha$ )が移動機構に関与していると考えられている<sup>1)</sup>。

PKC $\alpha$ は通常細胞質内に存在するが、細胞が刺激を受けた際、活性化し細胞質から細胞膜へ局在を変化することが報告されている。そのため、PKC $\alpha$ の局在変化を調べることはPKC $\alpha$ を介した情報伝達を調査する上で重要であると考えられる。しかしながら、PKC $\alpha$ の局在変化と活性化は薬剤刺激による細胞で多く確認されているが力学刺激による応答は確認されていない。

したがって本研究では細胞に局所的な引張りを与えた時の細胞内PKC $\alpha$ の局在を測定し、力学刺激とPKC $\alpha$ 局在変化の関連性を調査することを目的とした。

### 2. 実験方法

蛍光タンパク質 AcGFP で標識された PKC $\alpha$  を細胞内に発現させるために遺伝子導入を行った。ウシ血管内皮細胞をガラスベースディッシュ上に培養した後、リポフェクション法により PKC $\alpha$ -AcGFP 発現遺伝子を導入し、細胞内 PKC $\alpha$  の可視化を可能とした。遺伝子導入した細胞に  $\phi$ 2  $\mu$ m ラテックスビーズを接着させ、光ピンセットを用いてビーズを捕捉し移動させることで細胞に局所引張を負荷した。ビーズの捕捉時間は 1 分間とした。実験データは Scheffe 法を用いて検定を行った。

### 3. 実験結果

次に PKC $\alpha$  の局在変化を時系列で示したものを図 1 に示す。刺激を加えたビーズ周辺の蛍光輝度が上昇した。またビーズを中心に引張方向と同側では、引張負荷後 30 秒まで蛍光輝度が約 2 倍に上昇し、その後同じ数値で推移した。一方ビーズを中心に引張方向と逆側

では引張負荷後 30 秒で蛍光輝度が 1.4 倍に上昇し、その後変化がなかった。

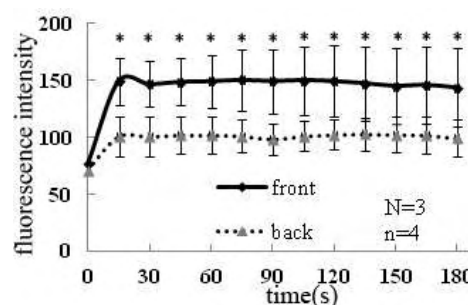


Fig. 1 Fluorescence intensity on the cell

\*P < 0.01 versus back side at the same time

### 4. 考察

図 1 より細胞に局所引張を負荷すると、負荷部分に PKC $\alpha$  が移動してくることが分かった。PKC $\alpha$  の活性化は G タンパク質が DAG と結合することで起こると報告されているので<sup>2)</sup>、本結果は負荷部位周辺でのみ G タンパク質と DAG が結合し PKC $\alpha$  が移動してきたと考えられる。またビーズを中心に刺激方向と同じ側と逆側で PKC $\alpha$  の集中度合いが異なった。これは PKC $\alpha$  の移動が引張方向によって異なる局在をとる性質があると考えられる。

### 5. 結言

光ピンセットを使用した引張負荷方法によって単一細胞の局所部分に刺激を負荷することが出来た。局所引張を負荷すると引張負荷部分にのみ PKC $\alpha$  が集中することが示唆された。

### 文 献

- 1) Sirosh, M.: Regulation of skin microvasculature angiogenesis, cell migration, and permeability by a specific inhibition of PKC $\alpha$ . *Journal of Investigative Dermatology.*, **126**, 460-467, 2006.
- 2) Oscar, R.: Protein kinase C is a mediator of the adaptation of vascular endothelial cells to cyclic strain in vitro. *Surgery.*, **112**, 459-466, 1992

## せん断応力負荷時の血管内皮細胞内アクチン局在特性

荒井雅貴\*, 寺田麻理枝\*\*, 工藤奨\*\*\*

\*九州大学大学院 工学府 機械工学専攻 [〒819-0396 福岡県福岡市西区元岡 744 番地]

\*\*芝浦工業大学大学院 理工学部 機械工学専攻[〒135-8548 東京都江東区豊洲 3-7-5]

\*\*\*九州大学大学院 工学研究院 機械工学部門[〒819-0396 福岡県福岡市西区元岡 744 番地]

### 1. 緒言

血管は酸素や栄養素の補給など生命活動を維持するために全身に張り巡らされており、血管の最も内側には血管内皮細胞が存在し、血流によるせん断応力や血管収縮・拡張による引っ張り刺激を常に受けている。

せん断応力負荷時の細胞の形態変化は、流れの下流部分において細胞が流れ方向に伸展し、上流部分においては伸展が見られないことが報告されている<sup>(1)</sup>。これらの反応の違いには、細胞骨格であるアクチンが関与していると考えられているが、アクチンの部位による変化の違いは観察されていない。

そこで本研究では、せん断応力負荷時の内皮細胞内アクチンの局所部位ごとの反応を調査することを目的とし、UV 照射部位のみ蛍光可能な蛍光タンパク質 Dronpa-Green1 をアクチンと融合することにより局所観察を可能にした。

### 2. 実験方法

#### 2. 1 遺伝子 pDG1-Actin の作製

せん断応力負荷時における内皮細胞内アクチンの局所的な特性を観察するために、アクチンと蛍光タンパク質 DG1 (Dronpa-Green, Amalgaam) の融合タンパク質を発現する遺伝子 pDG1-Actin を作製し細胞内に導入することで可視化した。

#### 2. 2 細胞へのせん断負荷方法

細胞にせん断応力を負荷するために平行平板型のフローチャンバーを使用した。せん断応力負荷は 2 Pa とし、灌流液は HBS (Hepes Buffered Saline) を用いた。せん断応力負荷時間は 1 時間とした。

#### 2. 3 せん断応力負荷時の actin の動態

蛍光観察には倒立顕微鏡と 40x 油浸レンズを用いた。波長 488 nm の励起光をキセノンランプで照射し 513 nm の pDG1-Actin の蛍光を観察した。

光転換のための波長 355 nm の UV 光を Nd:YAG レーザで発振した。レーザーフォトリシスシステムを用いることで励起光と UV 光を同時に細胞に照射することを可能にし、特定の部位の DG1-Actin のみを可視化できるようにした。

### 3. 実験結果

#### 3. 1 せん断応力負荷時の局所でのアクチンの蛍光変化

pDG1-Actin 導入細胞にせん断応力を負荷し、局所でのアクチンの変化を観察した(Fig.1a)。Fig.1a の白丸部分に UV を照射後、時間経過に伴い照射位置の蛍光が減衰している様子が観察された。

#### 3. 2 せん断応力負荷時の局所でのアクチンの蛍光減衰

せん断応力負荷時の UV 照射位置の蛍光輝度の減衰が一定の値(1/e)に達するまでの時間を  $\tau$  (時定数) とし、せん断負荷時間ごとの  $\tau$  の変化をグラフ化した (Fig.1b)。上流部ではせん断応力負荷時間に伴い、 $\tau$  に増加傾向が見られるが、下流部では減少傾向が見られた。また、せん断負荷 30, 40 分後に下流部と上流部で有意な差が見られた。

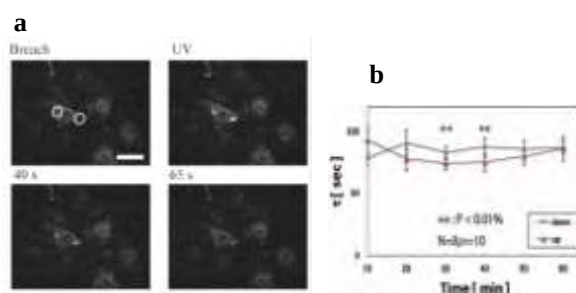


Fig 1. (a)アクチンの蛍光変化(スケールバーは 30  $\mu$ m). (b)せん断応力負荷時間における  $\tau$  の変化

### 4. 結言

pDG1-Actin 導入細胞により、せん断応力負荷時の局所でのアクチンの観察が可能になった。

またせん断応力負荷時、上流部と下流部では異なる変化を示し、このことは部位によるアクチンの重合・脱重合の速度が異なることが影響していることが示唆された。

### 文 献

- 1) Colin K. Choi and Brian P. Helmke, Short-Term Shear Stress Induces Rapid Actin Dynamics in Living Endothelial Cells : Mol Cell Biomech, January 1, 5(4): 247–258, 2008



## チョウザメ由来アテロコラーゲンのゲル化に伴う粘弾性変化

関口拓磨\*, 槇靖幸\*, 近藤信吾\*, 土橋敏明\* (群馬大院、工) 元村まみ\*\*, 市川寿\*\* (長崎大院、水産・環境科学)、小柳佳子\*\*\*、岸村栄毅\*\*\*、安部智貴\*\*\*、足立伸次\*\*\*、都木靖彰\*\*\* (北大院、水産)

\*群馬大学大学院工学研究科 [〒376-8515 桐生市天神 1-5-1]

\*\*長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科 [〒852-8521 長崎市文教町 1-14]

\*\*\*北海道大学大学院水産科学研究院 [〒041-8611 北海道函館市港町 3-1-1]

### 1. 緒言

魚由来コラーゲンやゼラチンは家畜由来のものの代替品として食品などへの利用が注目されているが、ゲル強度が小さいことが可能な応用の範囲を狭めてきた。本研究では、酵素による抽出によりゲル強度の低下を抑えたチョウザメ皮由来アテロコラーゲンの水溶液について粘弾性測定を行い、ゲル化に伴う変化を調べるとともに、その応用の可能性について検討した。

### 2. 実験方法

ベスカル・チョウザメの体側表皮を 1%NaCl、0.2 M NaOH、0.2 M HCl、蒸留水、99.5%エタノールに順次浸漬させ、夾雑物を除去した。次に、100 倍量 0.1 M HCl 中に懸濁し、5°Cでカツオ胃ペプシンを加え分解抽出を行った。その後、1 M NaCl で透析し、遠心後、透析脱塩し、凍結乾燥させた。さらに、試料に含まれる色素を 5%過酸化水素水処理によって除去し、試料とした。アテロコラーゲン濃度は 1-3 wt%とした。動的粘弾性測定は二重円筒式外筒回転型レオメータ Elquest 社製 (rheologia-A300) により行い、測定条件は、周波数 0.1-2 Hz、ひずみは 0.02 である。温度範囲は 5°C- 35°Cとした。

### 3. 結果と考察

貯蔵弾性率  $G'$  と損失弾性率  $G''$  とも濃度の増加とともに増加した。また、ゲル状態では周波数依存性が顕著に見られた。昇温過程と降温過程における 2wt%アテロコラーゲン水溶液の貯蔵弾性率の変化を Fig. 1 に示す。また、昇温過程における貯蔵弾性率と損失弾性率の周波

数依存性を Fig. 2 に示す。大きなヒステレシスが見られるとともに、ゲルの融点付近で  $G'$  と  $G''$  の値が逆転し、周波数依存性は  $G' \sim G'' \sim \omega^n$  で表され、Winter-Chambon の式で表される通常のゲル融解挙動を示した。すなわち、定性的挙動は家畜由来ゼラチンと同様であった。ゲルの融点と弾性率の値はともに家畜由来ゼラチンよりやや小さい値だが、高齢者向け食品のとりみ剤などへの利用が可能であると考えられる。

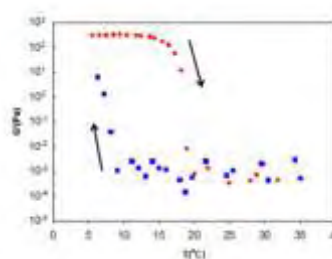


Fig.1 Storage modulus of 2 wt% atelocollagen aqueous solution during cooling and heating processes.

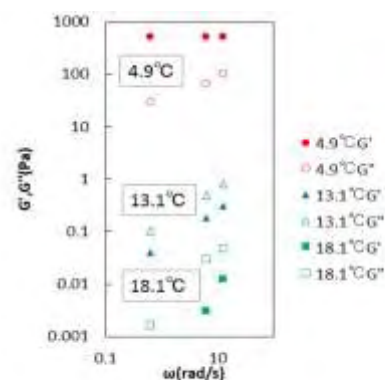


Fig.2 Storage modulus and loss modulus of 3 wt % atelocollagen aqueous solution as a function of angular frequency at 4.9 °C (gel state), 13.1 °C (critical state) and 18.1 °C (sol state).

## 豆乳・米粉混合ゲルの酸凝固

吉村美紀\*, 江口智美\*, 東羅あかね\*\*, 中川究也\*\*\*

\*兵庫県立大学環境人間学研究所 [〒670-0092 兵庫県姫路市新在家本町 1-1-12]

\*\*兵庫県立大学環境人間学部 \*\*\*兵庫県立大学工学研究科

### 1. 緒言

タンパク質と澱粉は食品中に多く含まれる高分子成分であり食品ハイドロコロイドとしての役割を担っている。本研究では、タンパク質の酸凝固に及ぼす澱粉の相互作用について、豆乳と米粉の混合系を用いて、豆乳と米粉濃度の影響について検討を行った。また、油脂添加の影響を検討した。

### 2. 実験方法

(1) 試料：豆乳（国産大豆サチユタカ豆乳：㈱あんにんさん製，姫路市）を豆乳濃度計（SM-20E：㈱アタゴ製）により濃度 5, 7, 9, 10.5, 11%とした（以下 so5, so7, so9, so10.5, so11 と示す）。米粉（上新粉：前原製粉㈱製），油脂（パーム油：イエナ商事㈱製，マレーシア産），酢酸（特級：和光純薬工業㈱製）を以下の比率で調製した。

試料調製①：so5, so7, so9, so10.5 各 100mL×3 にそれぞれ米粉 0g, 5g, 10g を加え混ぜた後，油脂 50mL を加え 1 分間ホモジナイズ（13500rpm）

（T25 デジタル ULTRA-TURRAX：IKA ジャパン㈱製）した。その試料 20g×5 をそれぞれ攪拌しながら酢酸 0%, 0.05%, 0.1%, 0.15%, 0.2% 滴下し，5℃で 48 時間密閉保存し 60 試料を調製した。動的粘弾性周波数依存性試料とした。

試料調製②：so7, so9, so11 各 100mL×2 にそれぞれ米粉 5g を加え混ぜた後，油脂 0mL, 50mL（以下 po0, po50 と示す）を加え 1 分間ホモジナイズした。その試料 20g×2 をそれぞれに酢酸 0.05%, 0.2% 滴下し，ガラス棒で 10 回攪拌し 12 試料を調製した。動的粘弾性時間依存性試料とした。

(2) 試料の加熱前後観察：25℃の試料を円柱型のガラスリング（直径 30mm, 高さ 10mm）で成型し，オーブン（高速ガスオーブン RSK-20A：リンナイ㈱製）により試料を 200℃で 5 分間焼成し，焼成前後の試料の高さと広がり程度を観察した。

(3) 動的粘弾性測定：レオメーター（HAKKE

RS600：英弘精機㈱製），直径 35mm の平板プランジャーを用いた。調製①の貯蔵剛性率  $G'$  及び損失剛性率  $G''$  の周波数依存性を 25℃で測定した。調製②料の時間依存性を 60 分間測定した。

### 3. 実験結果

(1) 試料の加熱前後観察

調製①の酢酸 0%の試料では，加熱前は著しい分離が認められた。試料の米粉量が多く豆乳濃度が高いほど，ゲル化の傾向が見られたが，豆乳濃度に対する酢酸量が少ない場合はゲル化が進まなかった。焼成後は，全試料において，試料の米粉量が多く豆乳濃度が高いほど，膨らみが増し広がり程度の減少傾向が見られた。

(3) 動的粘弾性測定：調製①試料の周波数依存性では，酢酸濃度 0%では液体挙動を示し，酢酸濃度 0.05～0.2%では酢酸量の増加に伴い  $G'$  及び  $G''$  の値は大きくなり， $G' > G''$  となった。

調製②の so7, so9, so11 において，po50 の  $G'$  及び  $G''$  の時間依存性では，初めゆるやかに上昇し，ある点で急上昇し，またゆるやかに上昇し 60 分後では，po0 < po50 となった。

### 4. 考察

豆乳・米粉混合は，酢酸無添加では液体を示し，酢酸量の増加に伴い強いゲルを形成するが，米粉と豆乳濃度に応じて最も強いゲルになる酢酸量は異なることが推察された。また，油脂添加では，初期では油脂がゲル化を抑制するが，ある点からゲル化を促進し，その後はゆるやかに進行することが推察された。

### 5. 結言

豆乳・米粉混合は，米粉と豆乳濃度に適した酸添加でゲルが強くなり，また油脂添加はゲル化速度に影響を及ぼす。

## うどん麺のテクスチャーに及ぼす 投入温度とタピオカ澱粉配合の影響

江口智美\*, 山本美晴\*\*, 吉村美紀\*

\*兵庫県立大学大学院 環境人間学研究科 [〒670-0092 兵庫県姫路市新在家本町 1 丁目 1-12]

\*\*兵庫県立大学 環境人間学部

### 1. 緒言

エステル化タピオカ澱粉を配合したうどんは、滑らかでやわらかな弾力に富んだ食感が好まれるが、吸熱量が大きく湯のびしやすい。この吸熱量が大きい特性は省エネ調理に有効ではないかと考え、先行研究<sup>1)</sup>では、消火後の余熱を利用したむらし調理を導入してうどんを調製した場合、糊化の進行や嗜好性に悪影響がないことを確認した。本研究では、沸点到達前からのゆで調理の有効性について検討を試みた。一般に、乾麺をゆでる温度は高い方がよく、「沸騰した」湯を用いてゆでるとされる。「沸騰」の用語から認識する沸騰状態は受け手により異なる<sup>2)</sup>が、麺投入時の調理水温が麺の物性や嗜好性に与える影響についての報告はほとんど見当たらない。近年は内部温度の上昇が早い細麺が生産比率の 75%程度を占めており、沸点到達前の投入による調理でも嗜好性を維持できる可能性があると考えた。また、麺のゆで調理では、鍋中の対流の状態がおいしさに影響するとされており、具体的にどのような状態が良いのかは明らかではないが、沸点到達前の投入はむらし調理よりも対流のある状態で加熱できると考えた。

### 2. 実験方法

乾麺の糊化温度 56~71℃<sup>1)</sup>を考慮しながら、沸点到達前の投入温度を予備検討し、80℃とした。80℃はプツプツと少し沸いてきた状態<sup>2)</sup>であり、沸騰前に音がし出す段階として判断できる。糊化開始温度より低い温度（50℃）での投入は、食用に適さなかった。最終的には対流がおき、糊化温度にも達するが、投入後の糊化が遅れるため、余分な水分を含んだ表面が溶け出したと考えられる。

東亜食品工業㈱製、2×3×210 mm の小麦粉乾麺（以下 WF）とエステル化タピオカ澱粉 10%配合乾麺（以下 ETS）を用いた。ステンレス鋼製鍋、電磁調理器、イオン交換水 2L を用い、水温が 80℃と 100℃に達した時点で乾麺 160g を投入し 10 分間ゆでた。消費電力量の算出、走査型電子顕微鏡観察（JCM-5000, 日本電子㈱製、高真空モード、10kV, ×1000）、貫入試験（RE-3305, ㈱山電製、

φ=3.0mm (No.4), 1.0mm/s, 最大貫入歪 0.95), 官能評価 (n=30, 22.0±2.3 歳) を行った。

### 3. 実験結果

80℃投入では、100℃投入と比較し、加熱時間の短縮に伴い、18%の消費電力量が削減された。

乾麺の走査型電子顕微鏡観察では、WF は、20~35μm 程度の澱粉粒子の間を、2~10μm 程度の粒子が隙間なく埋めていた。ETS は、20μm~30μm 程度の粒子の間に、2~10μm 程度の粒子が見られたが、WF よりも 2~5μm 程度の粒子が少なく、隙間が広がった。

こしの評価指標である貫入エネルギーは、WF, ETS とともに、80℃投入と 100℃投入の間に有意差はなかった。官能評価による滑らかさ（識別、嗜好）は、WF, ETS とともに、80℃投入と 100℃投入の間に有意差はなかった。こし（嗜好）は、WF, ETS とともに、80℃投入の方が 100℃投入よりも有意に好まれた。硬さ（嗜好）、総合的な好ましさは、WF では、80℃投入と 100℃投入の間に有意差はなかったが、ETS では、80℃投入の方が 100℃投入よりも有意に好まれた。

### 4. 考察

ETS では、大粒子群と小粒子群から成る小麦澱粉の割合が減少し、タピオカ澱粉の中粒子が増加するため、澱粉粒子間の隙間が広くなり、吸水膨潤や糊化が進みやすい構造を示したと考えられる。

WF, ETS とともに、80℃投入と 100℃投入でこしや滑らかさに違いはなかったが、糊化が進みやすい ETS では、80℃投入の方が 100℃投入よりもやわらかくなりすぎず、好まれたと考えられる。

### 5. 結言

細麺の 80℃投入によるゆで調理は有効である。

### 文 献

- 1) 江口智美, 山崎理加, 吉村美紀: キャッサバデンプン配合麺の調製時におけるむらし操作時間導入の効果に関する研究, 日本調理科学会誌, **44**, 417-426, 2011.
- 2) 福留奈美: 調理における沸騰を表す用語・表現の言語間の比較, 第 39 回食品の物性に関するシンポジウム講演要旨集, pp. 33-36, 2012.

## 飲料中亜硝酸の還元による NO 産生

小川武人, 望月精一

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床工学科 [〒701-0193 岡山県倉敷市松島 288]

### 1. 緒言

野菜などの食物に含まれる硝酸イオン ( $\text{NO}_3^-$ ) は口腔内で亜硝酸イオン ( $\text{NO}_2^-$ ) に還元され、抗酸化物質（還元剤）と摂取されると胃内で一酸化窒素 (NO) に還元されることが知られている。NO は、血管弛緩作用、抗血栓性、抗動脈硬化作用などが知られており、その生成機序を解明することは重要である。そこで本研究では、飲料に含まれる抗酸化物質による酸性条件下での  $\text{NO}_2^-$  からの NO の産生の評価を試みた。

### 2. 実験方法

サンプル飲料として、抗酸化物質を有することが知られている野菜ジュース、トマトジュース、緑茶、コーヒー、赤ワインを使用した。これらのサンプル飲料を  $\text{NO}_2^-$  を含有したクエン酸緩衝溶液 (pH 2, 50 mL) 中に添加した。その際に生成した NO は、NO センサ (amiNO-700; 米国 Innovative Instruments 社) で測定した。なお、 $\text{NO}_2^-$  と  $\text{NO}_3^-$  の濃度測定には NOx 分析器 (ENO-20; エイコム) を用いた。

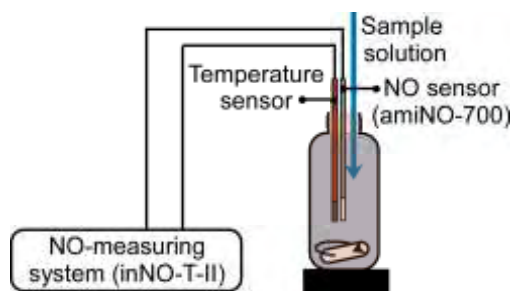


Fig. 1: NO-measuring system equipped with an NO sensor

### 3. 実験結果および考察

各サンプル飲料を  $\text{NO}_2^-$  含有する緩衝液に添加したところ、全てのサンプル飲料について NO 産生が認められた。生成した NO 濃度は、飲料の種類と量、 $\text{NO}_2^-$  の添加量に依存していた。野菜ジュースやトマトジュースと比較して、緑茶、コーヒー、赤ワインで高値を示した。緑茶、コーヒー、赤ワインは、各々カテキン、クロロゲン酸、タンニンを多く含有しており、これらのポリフェノール類は、強力な還元力を有し、NO 産生において有効な

還元物質あると考えられた。一方、野菜ジュースは、様々のビタミン類を含有し、トマトジュースは、多量のリコピンを含有している。しかし、ポリフェノール類よりも還元力が弱いことが知られている。ここで、緑茶と赤ワインは、各々ビタミン C、亜硫酸塩を含有しているが、これらの物質も抗酸化作用がある。そこで、ビタミン C、亜硫酸塩を用いた実験を行ったところ、緑茶と赤ワインからの NO 産生は、これらの還元物質ではなく、その他の含有物質によることが明らかとなった。これは、ビタミン C と亜硫酸塩の濃度が極めて低かったためと考えられる。

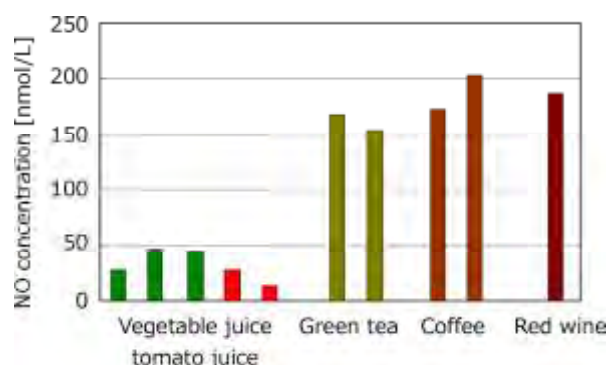


Fig. 2: Concentration of nitrite-derived NO generated by various types of antioxidants contained in drinks

### 4. 結言

酸性条件下で抗酸化物質を含有する様々な飲料による  $\text{NO}_2^-$  の還元による NO 産生を評価した。緑茶、コーヒー、赤ワインは、野菜ジュースやトマトジュースよりも高レベルの NO を産生したことから、高い還元作用を有しているポリフェノール類の寄与が大きいことが明らかとなった。

### 謝 辞

本研究は科研費 (23500534) , 川崎医療福祉大学医療福祉研究費の助成を受けたものである。

## 編集後記

第 36 回日本バイオレオロジー学会年会を開催するにあたり，多くの先生方のご協力をいただきました。心より感謝申し上げます。年会運営では参加される皆様にご迷惑をおかけすることが多々あるかと思いますが，ご容赦いただけますと幸いです。今回の年会では，韓国から 2 名の先生をお招きし，日韓ジョイントシンポジウムを企画いたしました。これを機会に韓国との交流が深まっていくことを望んでいます。福岡は海の幸が豊富な街です。学会期間中に是非ご堪能ください。皆様のご参加を心よりお待ちしております。

(工藤 奨，中嶋 和弘)

---

### 編集委員会

編集委員長 望月 精一

編集委員 市川 寿 喜多 理王 工藤 奨 坂元 尚哉  
櫻井 秀彦 一杉 正仁 山田 宏 山本 徳則

特別編集委員 中嶋 和弘

---

---

### 日本バイオレオロジー学会誌 (B & R, 電子版) 第 27 巻 第 2 号

2013 年 6 月 6 日発行

編集者 望月精一

発行者 谷下一夫

特定非営利活動法人 日本バイオレオロジー学会・事務局

〒376-8515 群馬県桐生市天神町 1 丁目 5 番 1 号

群馬大学大学院 工学研究科 応用化学・生物化学専攻 高分子物理化学研究室

TEL/FAX 0277-30-1427

E-MAIL office@biorheology.jp

# 年会タイムテーブル

第1日目 6月6日(木)

| 第1会場(大会議室) | 第2室(中会議室)                                         |
|------------|---------------------------------------------------|
|            | 13:00~15:00<br>理事会評議員会合同会議                        |
| 休憩         |                                                   |
|            | 16:00~18:00<br>バイオレオロジー・リサーチフォーラム<br>「細胞操作技術の新展開」 |

第2日目 6月7日(金)

| 第1会場(大会議室)                                 | 第2室(中会議室)                                        |
|--------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| 9:10~10:10 OS7 p.27~31<br>ヘルスケア食品レオロジー     | 9:10~10:10 OS5 p.42~46<br>ティッシュエンジニアリング・人工臓器(1)  |
| 休憩                                         |                                                  |
| 10:20~11:44 p.32~38<br>学術奨励賞応募講演           |                                                  |
| 11:44~12:40 昼食                             | 11:50~12:40 電子版 B&R 編集委員会                        |
| 12:40~13:16 OS1 p.39~41<br>血管障害と流体力学       | 12:40~13:28 OS5 p.47~50<br>ティッシュエンジニアリング・人工臓器(2) |
| 休憩                                         |                                                  |
| 13:50~14:50 p.22<br>特別講演「生体関節におけるバイオレオロジー」 |                                                  |
| 休憩                                         |                                                  |
| 15:00~17:30 p.23~26<br>日韓シンポジウム            |                                                  |
| 移動                                         |                                                  |
| 18:00~20:00<br>懇親会(ヒルトン福岡シーホーク)            |                                                  |

第3日目 6月8日(土)

| 第1会場(大会議室)                                          | 第2会場(中会議室)                                   |
|-----------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 9:00~9:48 OS6 p.52~55<br>生体物質の構造形成と機能発現・制御(1)       | 9:00~9:48 OS2 p.66~69<br>循環器ダイナミクスと疾患        |
| 休憩                                                  |                                              |
| 10:00~10:48 OS6 p.56~59<br>生体物質の構造形成と機能発現・制御(2)     | 10:00~10:48 OS3 p.70~73<br>血液レオロジーと微小循環(1)   |
| 休憩                                                  |                                              |
| 11:00~11:30<br>総会                                   |                                              |
| 11:30~12:30<br>昼食                                   | 11:30~12:30<br>Vascular Engineering 出版打ち合わせ会 |
| 12:30~14:00<br>学会賞受賞講演                              |                                              |
| 休憩                                                  |                                              |
| 14:15~14:45<br>ポスターセッション(多目的室)<br>コアタイム 14:15~14:43 | p.78~85                                      |
| 休憩                                                  |                                              |
| 15:00~16:12 OS4 p.60~65<br>細胞・分子のメカのバイオロジー          | 15:00~15:48 OS3 p.74~77<br>血液レオロジーと微小循環(2)   |