

血管平滑筋の力学的適応反応に関する研究

Mechanical adaptation of vascular smooth muscle cells

研究代表者 東北大学工学研究科機械電子工学専攻 助教授 松本 健郎
Takeo MATSUMOTO, Ph.D., Associate Professor, Biomechanics Laboratory, Graduate School of Mechanical Engineering, Tohoku University

Mechanical adaptation of vascular smooth muscle (SM) cells was studied in thoracic aortas of rats in which Goldblatt hypertension was induced for 2–16 weeks. First, SM contractility was evaluated by comparing pressure-diameter relations obtained under SM contraction and relaxation. Contractile length at each pressure and stress generated by the contraction at each diameter were calculated. Peak value of the contractile length and the pressure at the peak value were not significantly affected by the hypertension, while that of contractile stress and the diameter at the peak stress responded to hypertension. Second, effect of hypertension on in vivo strain distribution was evaluated under SM contraction and relaxation. Hypertension as well as SM contraction increased residual strain. Uniform strain distribution could be attained under a certain degree of SM contraction in any case examined. These results suggest that smooth muscle adaptively responds to change in mechanical environment.

1. 研究目的

生体には自己の内部環境を一定に保つ働き（ホメオスタシス）があるが、ひずみや応力（単位断面積あたりに作用する力）等の力学因子に対してもこれが成立つ場合があることが注目されている。

例えば高血圧により動脈壁は肥厚するが、これは内圧上昇に伴う張力増加を打消し、応力を一定に保とうとする反応と考えられる。実際、収縮期圧の壁内の平均応力は個々の個体の血圧に依らずほぼ同じであることが報告されている。

一方、平均値だけでなく、応力・ひずみの分布も一樣になっている可能性が指摘されている。一般に血管のような厚肉円筒管を加圧して膨らませると、その形状から内壁側の応力・ひずみが外壁側よりも早く増加するため、膨張に伴って内壁側に応力・ひずみの集中が生じることが知られている。しかし、内圧が0の状態の壁内に内壁側で圧縮・外壁側で引張の応力やひずみが残留していると膨張に伴う集中はキャンセルされることになる。実際、摘出した血管を輪切りにしてその輪の一箇所を切断すると輪が弧状に開くことから、このような残留応力・ひずみの存在が確認されており、応力・ひずみが果たして生理的な状態で壁内で一樣な値に保たれているのか、また、それが高血圧などの力学環境の変化に応じてどのように変化するのか興味を持たれて始めている。

ところで、このような適応反応は血管壁内の平滑筋細胞が周囲の力学環境を察知し、組織を再構築することで生じる。また平滑筋は自ら収縮・弛緩することで血管径とともに残留ひずみの量を変化させることも報告されており、短期的には壁内の応力・ひずみ分布を制御している可能性が指摘されている。従って平滑筋の力学環境に対する応答を詳細に解明することで、基礎生理学的な知見が深まると同時に、環境に応じて自らの性質を

化させる新たな機能性構造材料のアイデアが得られると期待される。このような観点から本研究では、ラットに人為的に高血圧を発症させ、その後の大動脈の力学的性質や壁内ひずみ分布が平滑筋の収縮と弛緩によりどのように変化するかを詳細に探ることを目的とした。

力学特性は摘出した試料を加圧して内圧と外径の関係を調べることから求めた。ひずみ分布の算出に際しては、残留ひずみを考慮するために、弧状に開いた輪切り標本の開き角（弧の両端とそこから等距離にある円弧上の点とがなす角）を計測した。これらの計測を平滑筋が収縮した状態・弛緩した状態の両方で行い、平滑筋収縮・弛緩が血管壁全体の力学特性や壁内のひずみ分布にどのような影響を与えるのか、そして、それが高血圧という円周方向の負荷の増加によってどのように変化するかを調べた。

2. 研究経過

2-1) 試料 実験動物にはウイスターラット（生後10週齢、♂）を用いた。左腎動脈に銀製クリップをかけて狭窄を作製し、腎性高血圧を発症させた。用いたクリップの間隙は、0.2～0.3mm程度である。収縮期血圧を週1回、尾動脈よりプレテスマログラフ法により測定した。血圧が160mmHgを越えたものを高血圧群として解析に使用した。手術後、2～16週飼育した後、屠殺して胸大動脈を円筒状のまま長さ25mm程度摘出し、試料とした。また、高血圧群と週齢を合せた未処置の動物を対照群とした。

2-2) 内圧一外径試験 摘出した円筒状試料の平滑筋収縮時および弛緩時の力学特性を知るために、内圧と外径の関係を調べた（図1）。摘出した円筒状試料の両端から開き角試験用に長さ1mm程度の短円筒状試料を切り出した後、試料を生体内長

に伸ばし、95%O₂、5%CO₂ガスで酸素加した37℃のKrebs-Henseleit solution (KH液)を満した試料槽内に取付けた。加減圧は、KH液にかかる空気圧を増減させることにより約1mmHg/secの速度で行った。血管内圧は圧力トランスデューサで計測し、血管の外径はCCDカメラで血管像を撮影し、これを画像処理装置に入力して2値化することによって求めた。両データをX-Yレコーダに入力し内圧-外径曲線を得た。

実験では、まず0~200mmHgの加減圧を内圧-外径曲線の形状が安定するまで繰返した後、内圧を50mmHgに保ちつつ、10⁻⁵Mのノルアドレナリン(NE)により平滑筋を収縮させ、外径が一定になるまで約40分間放置した。その後、0mmHgまで一旦減圧し、再び200mmHgまで加圧した。この加圧時の曲線を平滑筋収縮時の内圧-外径関係とした。最後に内圧を50mmHgに保持した状態で平滑筋弛緩薬のニトロプルシドナトリウム(SNP)を5X10⁻⁴Mの濃度で投与し、外径が一定になるまで約40分間放置した。その後、0~200mmHgの加圧と減圧を内圧-外径曲線の形状が安定するまで繰返し、安定した曲線のうち加圧時の部分を平滑筋弛緩時の内圧-外径関係とした。

2-3) 平滑筋収縮特性の評価 得られた内圧-外径曲線から平滑筋の収縮特性を評価した(図2)。即ち、平滑筋の収縮・弛緩両状態における内圧-外径曲線を比較することにより、同じ内圧

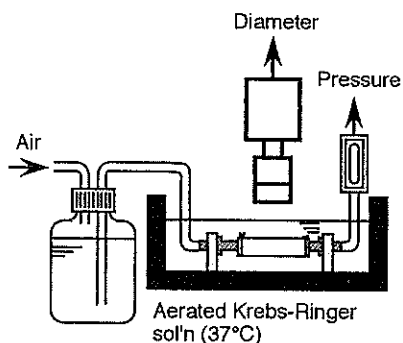


図1 血管内圧-外径関係計測装置

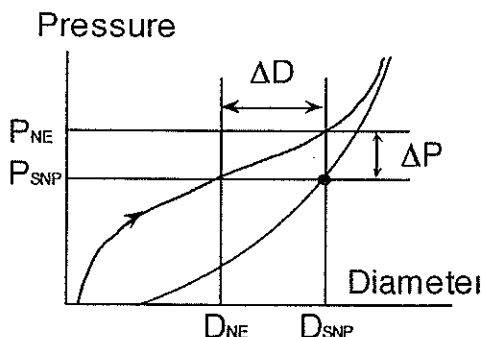


図2 活性収縮率および活性応力の算出方法

における径の減少量 ΔD および、同じ内径における内圧の上昇量 ΔP が求められる。 ΔD はその血管内圧における平滑筋の収縮量と考えられ、 ΔP はその血管径において平滑筋が発生した張力の指標と考えられる。このような考え方にに基づき、平滑筋収縮により生ずる活性収縮率 $\% \Delta D$ と活性応力 $\Delta \sigma$ をそれぞれ次式により求めた：

$$\%D(P_i) = 100 \times \frac{D_{o,SNP}(P_i) - D_{o,NE}(P_i)}{D_{o,SNP}(P_i)} \quad (1)$$

$$\Delta \sigma(\lambda_0) = \frac{(P_{i,NE}(\lambda_0) - P_{i,SNP}(\lambda_0))D_i(\lambda_0)}{D_o(\lambda_0) - D_i(\lambda_0)} \quad (2)$$

ただし、 D_i 、 D_o は各々血管の内径と外径を示し、 P_i は内圧を示す。添え字のNE、SNPはそれぞれ収縮剤であるNE、弛緩剤であるSNPを投与した場合であることを示している。式(2)の λ_0 は円周方向伸長比であり、 $\lambda_0 = D_o/d_0$ と表される。ここで d_0 は無負荷状態における血管外径である。また、式中において $D_o(P_i)$ は内圧が P_i の時の外径を示し、 $P_i(\lambda_0)$ は円周方向伸長比が λ_0 である時の内圧を示す。

2-4) 開き角の計測 円筒状試料の両端から得た短円筒状試料の輪を切り開いた後、これを37℃の酸素加KH液の入ったバスに移し、試料に余計な外力が作用しないよう外膜中央部を内径0.3mmのガラスピペットで軽く吸引して液中に固定した(図3)。バスを顕微鏡下に置き、顕微鏡に取付けたCCDカメラで試料形状を撮影しつつ30分程度放置し、形状変化が止んだ時点で10⁻⁵MのNEにより平滑筋を収縮させ、その後の形状変化をビデオ録画した。形状が安定した時点でKH液を取替え、これにSNPを10⁻⁵Mの濃度で加え、その後の形状変化を録画した。開き角の算出は試料形状を画像処理装置にマウスを用いて取込み、自家製プログラムにより行った。

2-5) 血管壁内ひずみ分布の算出 血管壁が等方・均質・非圧縮性であり、リング切断の前後で試料

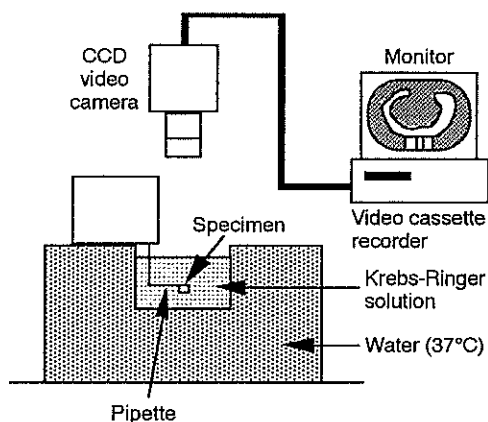


図3 開き角測定装置

の平均周長および壁厚が不変で、かつ試料形状が切断前は円、切断後は円弧であるという仮定の下に壁内ひずみを伸び比として算出した。即ち、図4に示すように座標系をとると負荷状態の半径方向座標 R における円周方向の伸び比 $\lambda_\theta(R)$ は次のように与えられる。

$$\lambda_\theta(R) = \frac{\pi R}{\theta r^*} \quad (3)$$

ただし θ は円弧の中心角の半分（即ち円周角）であり、 r^* は R に相等する無応力状態の座標で

$$r^* = \sqrt{r_o^{*2} - \frac{\pi \lambda_z}{\theta} (R_o^2 - R^2)} \quad (4)$$

と表される。なお、 λ_z は無負荷状態に対する生理状態の軸方向伸長比であり、 r_o^* は円弧の外半径で、

$$r_o^* = \frac{1}{2} \left\{ \frac{\pi}{\theta} (r_o + r_i) + (r_o - r_i) \right\} \quad (5)$$

である。

3. 研究成果

3-1) 平滑筋収縮能の推移 図2から模式的に推察されるように血管内圧-活性収縮率関係、血管径-活性応力関係はそれぞれ血管内圧および血管径に関して共に単峰性の曲線となる。そこでこのピークの値および、その時の条件が高血圧とともにどのように推移するか調べた。

活性収縮率のピーク値 $\% \Delta D_{max}$ の経時変化を図5に示す。対照群においては $\% \Delta D_{max}$ は加齢とともに低下していた。高血圧群においても同様な低下が見られたが、16週において高血圧群の方が対照群に比べて有意に小さかった。即ち、平滑筋の収縮長さは加齢により減少し、高血圧がこの減少を加速することを示唆する結果であった。

またピーク値を与える条件として、最大収縮を与える内圧 P_{AC} を調べたところ、対照群、高血圧群ともに経時変化は見られず、両群間にも有意差はなかった。しかしこの内圧を夫々の動物の生理的血管圧 P_{SYS} で規格化した値 P_{AC}/P_{SYS} を調べたところ、両群ともに経時変化は見られなかったものの、高

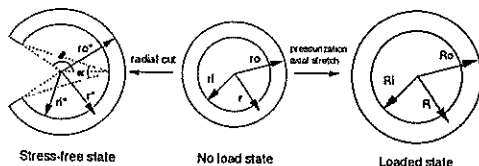


図4 血管壁の座標系

血圧群の値は対照群と比べて低い傾向にあった。このことから高血圧は P_{AC} に対し顕著な影響を与えないことが示唆された。

活性応力の最大値 $\Delta \sigma(\lambda_\theta)_{max}$ の推移を図6に示す。対照群には経時変化は見られなかった。高血圧群では、8週に向けて活性応力が増加した後、16週で大きく減少した。このことは、高血圧によって平滑筋の応力を発生する能力が一旦、亢進するものの、その能力の水準は維持されないことを示していると考えられる。

またピーク値を与える条件として、活性応力が最大になる時の外径 D_{max} を収縮期血圧における外径 D_{sys} によって規格化した値 D_{max}/D_{sys} の変化を調べた。対照群に経時変化は見られなかったが、高血圧群に関しては、2週で一旦低下した後、上昇して16週においては対照群の間に有意差は認められなかった。このことは、最大収縮応力を発生する外径は

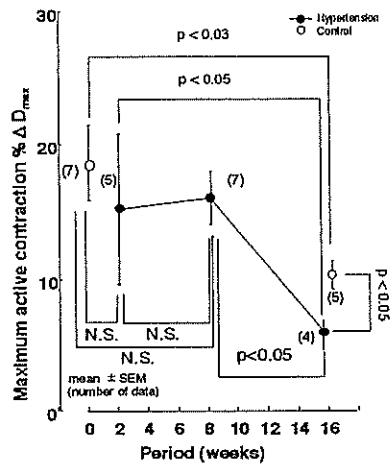


図5 最大活性収縮率の推移

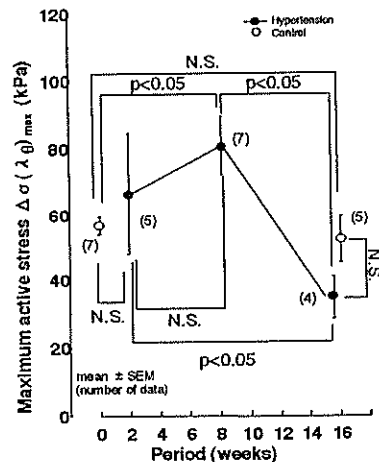


図6 最大活性応力の推移

血圧の上昇に伴って元の相対位置に戻ってくることを示しており、 D_w が何らかのレギュレーションを受けていることを示す結果と考えられた。

3-2) 開き角・ひずみ分布の推移 平滑筋収縮・弛緩状態における開き角の経時変化を図7に示す。収縮状態における開き角には対照群、高血圧群ともに経時変化は見られず、また両群間にも有意差はなかった。一方、弛緩状態における開き角は両群ともに経時的に増加しており、増加量は高血圧群においてより顕著であった。このことは弛緩状態の開き角は加齢および血圧の上昇により増加するものの、平滑筋が最大収縮した状態での値には殆ど変化が見られないことを示している。

内圧-外径関係ならびに開き角の計測結果から夫々の動物の生理的圧 P_{SYS} におけるひずみ分布を平滑筋が収縮した状態と弛緩した状態について計算した。分布がどのくらい一様分布に近いかを示す指標として、外壁側のひずみを内壁側のひずみで除した値 k をまとめて図8に示す。いずれの

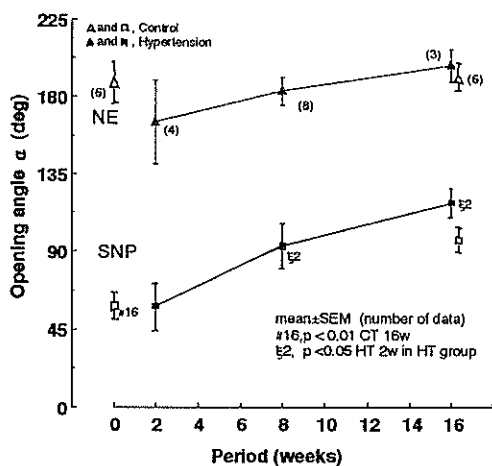


図7 開き角の推移

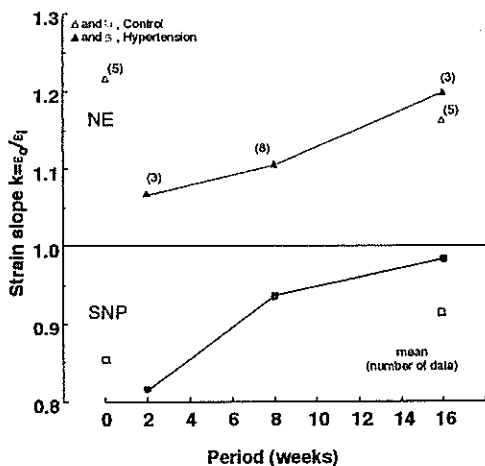


図8 ひずみ分布の推移

時点でも平滑筋が中間的な収縮状態を取る時にひずみが一様に成り得ることが判る。しかしその状態 ($k=1.0$ の位置) は対照群では平滑筋が弛緩した条件(SNP)に近い位置にあるのに対し、高血圧群では一旦収縮状態(NE)に近い位置に移った後、弛緩状態に近い位置に戻ってくるようであり、血管壁内のひずみ分布を制御する範囲も何らかのレギュレーションを受けている可能性が考えられた。

4. 今後の課題と発展

本研究では、まず平滑筋の収縮能の高血圧による変化を平滑筋の収縮長さや発生応力という2つの点から考察した。収縮長さの最大値は加齢と共に減少し、高血圧がその変化を加速するのみであったのに対し、発生応力の最大値は、高血圧に伴い一旦上昇した後、減少する傾向を示していた。最大収縮量を与える内圧は高血圧によっても変化せず、その収縮期血圧に対する相対値は高血圧群では低いままであったのに対し、最大発生応力を与える外径の相対値は高血圧により低下したものの16週経過後には対照群の値に復帰していた。以上の結果から、高血圧という力学環境の変化に敏感に反応するのは発生張力であり、収縮長さは環境の変化に対する応答性に乏しい可能性が示唆された。そこで今後は血管平滑筋の収縮機構を収縮長さや収縮張力とのふたつの側面から別々に調べていく必要がある。このためには細胞収縮に伴う細胞内微細構造の観察や細胞内代謝の変化などの側面からの研究が必要になってくると考えられる。

本研究で着目した2番目の点、平滑筋による壁内のひずみ分布の制御に関しても力学環境の変化に応じた積極的な応答が見られた。平滑筋収縮・弛緩に伴う開き角の変化には血管壁内の局所的な弾性特性の差や内壁側・外壁側の平滑筋の収縮特性の差などが関与しており、内圧-外径試験から得られる平滑筋の収縮特性のみからは解明できない部分が多い。従って血管壁を酵素により分解し壁内の平滑筋を単離して個々の平滑筋の特性を調べる必要が出てくる。このような観点から、今後は細胞単体の収縮特性を計測する装置の開発が必要と考え、現在、開発を進めている所である。

5. 発表論文リスト

- 1) 加藤陽子, 松本健郎, 佐藤正明: 高血圧がラット胸大動脈平滑筋の収縮特性に与える影響, 日本機械学会東北支部第33期総会・講演会講演論文集193-194 (1998)
- 2) 加藤陽子, 松本健郎, 佐藤正明: 高血圧によるラット胸大動脈平滑筋の収縮特性の変化, 日本機械学会第76期全国大会講演論文集 (印刷中)
- 3) Matsumoto T, Okumura E, Miura Y, Sato M: Mechanical and Dimensional Adaptation of Rabbit Carotid Artery Cultured in Vitro, Medical & Biological Engineering & Computing (in press)