

# 流体－構造連成解析による流れ負荷培養内皮細胞の構造最適化 シミュレーション

Structural Optimization Method of Sheared Endothelial Cells Using Coupled  
Fluid-Structural Analysis

大橋 俊朗<sup>\*</sup>, 清尾 慎司<sup>\*\*</sup>, 松本 健郎<sup>\*</sup>, 佐藤 正明<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>東北大学大学院工学研究科      <sup>\*\*</sup>東北大学大学院工学研究科 (現: 北海道電力)

Toshiro Ohashi<sup>\*</sup>, Shinji Seo<sup>\*\*</sup>, Takeo Matsumoto<sup>\*</sup> and Masaaki Sato<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Tohoku University

<sup>\*\*</sup>Tohoku University (Present: Hokkaido Electric Power Co., Inc.)

E-mail: ohashi@biomech.mech.tohoku.ac.jp

## 1 緒言

血管内皮細胞は全ての血管の内腔面を一層に覆っている細胞であり, 常に血流による圧力やせん断応力を受けて流れの方向に伸長・配向している. 実際に培養内皮細胞に流れを負荷すると, 静置培養下の内皮細胞はほぼ円形でランダムな方向に向いているのに対し, せん断応力負荷後は細胞は形態が細長くなり, 流れの方向に配向することが報告されている[1,2]. さらに同時に細胞内部では静置培養下では細胞辺縁部に細胞骨格成分の一つであるアクチンフィラメントが厚く分布しているのに対し, 流れ負荷後の細胞では細胞中央部に流れ方向に配向したアクチンフィラメントの長く太い束(ストレスファイバー)が発達することが知られている[3,4]. アクチンフィラメントは細胞の形態を維持するための重要な骨格成分であり, ストレスファイバーの発現は細胞が周囲の力学環境に適応する過程と考えられる. このような内皮細胞の形態および骨格構造の変化は細胞が流れによる力学的刺激を感知し, 何らかな最適構造をとるかのように再構築(リモデリング)を行っているものと考えられるが, 詳細なメカニズムはわかっていない. 細胞骨格は細胞の形態を維持する働きのみではなく, 細胞内における物質輸送, 細胞増殖, 細胞間相互作用などにも密接に関係しているため細胞の生理・病理を知る上で非常に重要である.

近年, 流れ場と血管内皮細胞の形態に注目した数値シミュレーションによる解析が行われつつある. Satcher ら[5]は三角関数により形成した内皮細胞表面形状を用いて細胞近傍における数値流体解析を行った. Barbee ら[6]は, ウシ大動脈由来の内皮細胞にせん断応力 1.2Pa を 24 時間負荷し, 原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope, AFM) によって細胞の表面形状を測定し, その形状を基に細胞表面の局所的な壁せん断応力を計算した. また Yamaguchi ら[7]はガウス分布関数を用いて細胞形状を模擬し, 細胞頂点におけるせん断応力が減少する場合のみを保存するというアルゴリズムで数値流体解析を行った. 以上の解析は内皮細胞表

面を流れの境界として定義した流体解析の例であるが、一方、内皮細胞は流れの影響を受けて変形し構造を変化させるので細胞のリモデリングを議論する場合には流体構造の連成解析が必要である。

我々はこれまでに細胞の形態と細胞内応力分布との間には密接な関係があるのではないかという仮定の下で研究を行ってきた。これまでに既報[8]ではAFMによって測定した流れ負荷ウシ培養内皮細胞の表面形状から有限要素法(Finite Element Method, FEM)による流体-構造モデルを構築し細胞内応力分布を求めた。その結果、細胞は流れ負荷に対して細胞内の応力集中を減少させるように形態を変化させていることが示唆された。しかし従来の解析モデルでは細胞に均質性を仮定していたため、骨格構造を再現できていなかった。そこで本研究では、細胞骨格を想定したアクチンフィラメント構造を有する新たなモデルを提案し、加えて構造最適化手法を取り入れ細胞の動的挙動を再現することを目指した。第一段階として単一の細胞に対してモデル化を行った。

## 2 実験および解析

### 2.1 培養内皮細胞

試料としてウシ大動脈由来の培養内皮細胞を用いた。クリーンベンチ内で血管外膜に付着した余分な脂肪を除去した後、内腔面をメスで軽く擦ることで内皮細胞を物理的に剥離した。培養液として10%の非働化したウシ胎児血清、および抗生物質1unit/mlを加えたダルベッコ改変イーグル培地(Gibco)を用いた。実験には直径35mmの細胞培養ディッシュに播種した4-9代目までの細胞を用いた。

### 2.2 流れ負荷実験

流れ負荷実験は平行平板型フローチャンバを用いて行った(Fig.1)。本装置は平行平板型I/Oユニット、ローラーポンプ、リザーバ、パルスダンパから構成されている。流路には、細胞培養に用いたものと同じ培養液をローラーポンプで灌流させており、培養液のpHを一定に保つためにリザーバに95%Air+5%CO<sub>2</sub>の混合ガスを吹き込んだ。リザーバおよびパルスダンパを恒温槽に浸すことで培養液を37℃に保った。流路の寸法は幅14mm、高さ0.5mmおよ

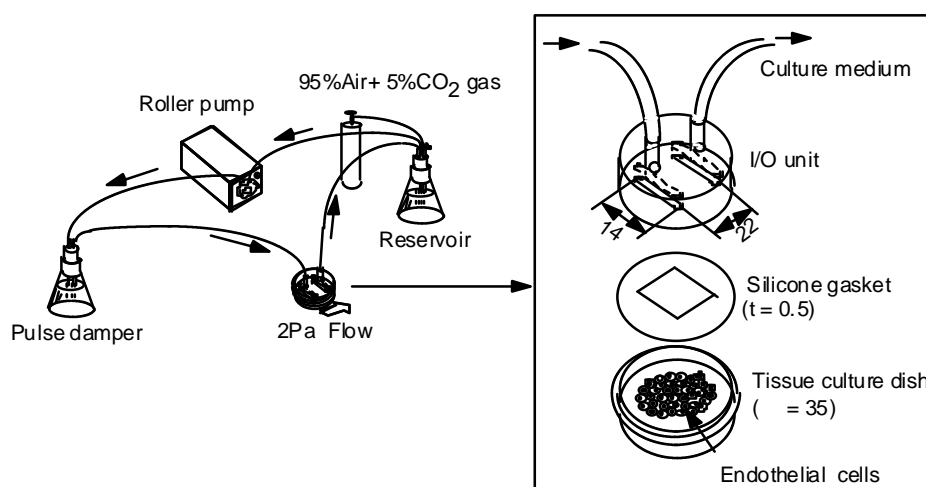


Fig. 1 Schematic diagram of flow-imposed experiments[8].

び長さ 22mm である。以上の流路を用いて細胞表面に大動脈の平均的なせん断応力 2Pa が負荷されるような流れを 6 時間負荷した。

### 2.3 表面形状計測と骨格構造観察

内皮細胞の表面形状および細胞骨格の蛍光像は、本研究室で製作した共焦点レーザー顕微鏡複合型原子間力顕微鏡[8,9]を用いて計測した。原子間力顕微鏡部分は光てこ方式を用いており、試料表面の様子はレーザー顕微鏡に備わっている位相差顕微鏡を通して CCD カメラに取り込まれモニター画面に映し出される。細胞表面形状の計測はカンチレバーの傾きが一定になるようにフィードバック制御を行いながら試料ステージを移動させ細胞表面を走査することにより行った。静置培養下の細胞(コントロール)および流れ負荷 6 時間の細胞について計測を行った。また、共焦点レーザー顕微鏡を用いてローダミン・ファロイジンにて染色を行ったアクチンフィラメント蛍光像を観察した。

### 2.4 流体-構造連成解析

AFM によって計測された内皮細胞の表面形状を用いて流体-構造連成解析の有限要素モデルを構築した。有限要素モデルは流れ負荷実験における細胞近傍の培養液および内皮細胞を想定して構築した。培養液部分を流体要素、細胞部分を構造要素でモデル化した。Fig.2 に内皮細胞を想定した構造モデルの概略を示す。構造モデルにおける細胞表面は AFM により得られたコントロールの細胞形状を用いている。モデル表面は細胞膜を模擬したシェル要素、細胞内部には細胞骨格を模擬したビーム要素を配置した。ビーム要素は図中に拡大して示すように格子状の構造をしている。シェル要素およびビーム要素の要素数はそれぞれ 784, 2356 であり、節点数は 1558 である。シェル要素には等方・均質性を仮定した。またポアソン比はシェル要素、ビーム要素共に非圧縮性を近似し 0.499 とした。シェル要素の物性値は弾性率を 300Pa[10]、膜の厚さは 5nm[11]とした。また、ビーム要素の弾性率は 2.2MPa[11]、初期形状における直径は 100nm とした。境界条件として底面の変位を拘束した。図には示していないが、構造モデルの上部には実際には流体モデルが配置してある。流体要素と構造要素は細胞表面において連続である。流体要素には培養液の物性値として密度  $1\text{g/cm}^3$ 、粘性係数  $9.6 \times 10^{-4}\text{Pa} \cdot \text{s}$  を与えた。流速は細胞が存在しない状態での壁せん断応力が 2Pa となるような線形な速度勾配を入口領域および出口領域に与えた。出口圧力は 0Pa とし、細胞表面においてはすべり無しとした。

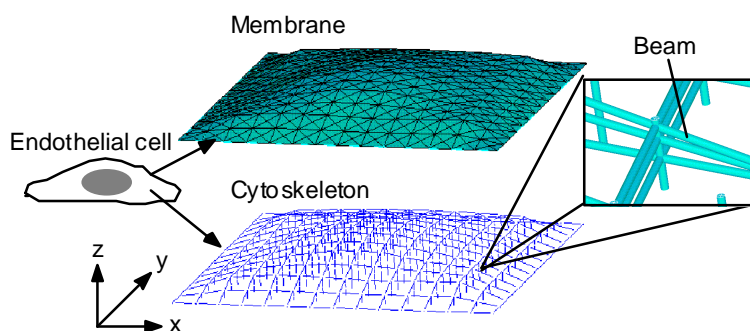


Fig. 2 Finite element model of the endothelial cell[12].

畔上らが提案した構造最適化手法[13]を修正したアルゴリズムを Fig.3 に示す。(1)AFM によって得られた細胞表面の3次元形状を基に有限要素モデルの初期形状を構築する。(2)流体構造連成解析を行う。ここでは細胞表面において流体解析で得られた壁せん断応力および圧力を構造解析に受け渡し構造解析を行う。(3)構造解析で得られた各ビーム要素の軸方向応力の値から次の計算ステップにおける目標応力値を求める。同時に次の計算ステップにおけるビーム直径を求めている。(4)現在のビーム直径と次の計算ステップにおけるビーム直径との比較を行い、直径の変化量が収束したと見なせる場合に解析を終了し最終形状を得る。ここで変化量が収束していない場合は次の手順へと移る。(5)構造解析の結果から得られた変位を考慮してモデル境界の修正を行う。この時に(3)で求めたビーム直径を適用する。(2)再び連成解析を行う。(3)におけるビーム直径の変更は式(1)に従っている。

$$R^{(t+1)} = R^{(t)} \{1 + a(s/s_c - 1)\} \quad (1)$$

ここで  $R^{(t)}$  と  $R^{(t+1)}$  はそれぞれ今回の計算ステップおよび次回の計算ステップにおけるビーム要素の直径、 $s$  は軸方向応力、 $s_c$  は目標応力、 $a$  は比例定数(0.1程度の小さな値)である。式(1)を用いて要素毎にビーム直径を繰り返し変化させることで、各要素が  $s/s_c = 1$  に収束するまで計算を行う。解析には汎用有限要素ソフト ANSYS 5.6 (SAS IP, Inc.) を用いて Work station (Sun Ultra10) 上で行った。

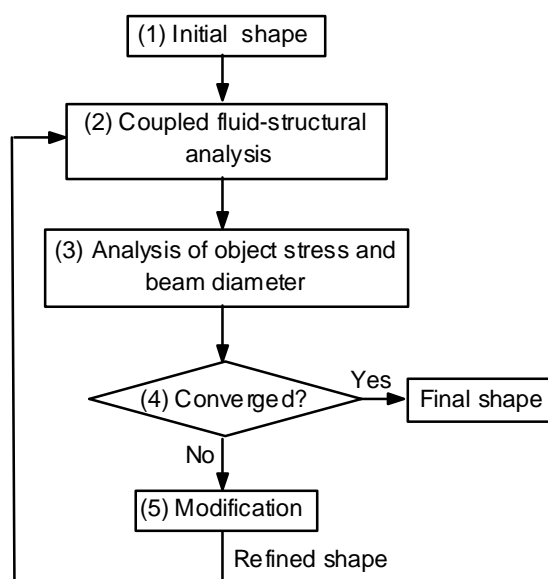
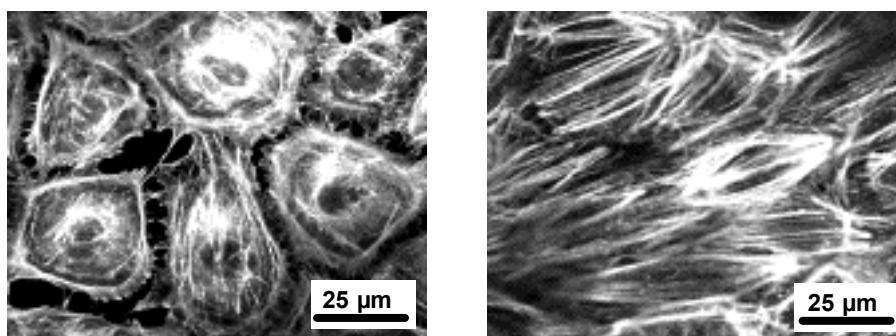


Fig. 3 Computational procedure for the structural optimization method[12].

### 3 結果および考察

AFM による細胞表面形状計測をコントロールと流れ負荷6時間の細胞について行った。コントロールで  $2.8 \pm 1.0 \mu\text{m}$  (mean  $\pm$  SD, n=15) だったのに対して流れ負荷後は  $1.9 \pm 0.8 \mu\text{m}$  へと有意に減少した。典型的なアクチンフィラメント蛍光像を Fig.4 に示す。コントロール



(a) Control

(b) Sheared, 6h

Fig. 4 Typical photomicrographs of rhodamine-phalloidin stained endothelial cells. (a) Control and (b) Sheared cells.

細胞では比較的丸い形状を示しており，細胞周囲にデンスペリフェラルバンドと呼ばれるアクチンフィラメントの集合が観察された．流れ負荷 6 時間の細胞では流れの方向に伸長・配向し，さらに流れの方向にアクチンフィラメントの束であるストレスファイバの発達が観察された．Kataoka ら [2] は流れ負荷 3 時間後から内皮細胞に有意な形態変化がみられ，6 時間で形態変化，ストレスファイバの発達共にほぼ均一化すると報告しており本研究でも同様の結果であった．

流体-構造連成解析から細胞の高さは計算ステップを繰り返す毎に減少し，この傾向は実験結果と一致していたが，その減少量は実験結果と比較して 10 分の 1 程度であった．初期形状と最終形状における流れ方向 (y 方向) のビーム形状を Fig.5 に示す．図ではビーム直径を 3 倍に拡大して示している．初期形状では一様であったビーム直径が，最終形状においては細胞表面近くのほぼ全てのビームで太くなる傾向が見られた．特に上流部および下流部においてその傾向は顕著であった．流れ負荷実験において流れ方向へのストレスファイバの発達が確認されたが，本解析においても同様の傾向が得られた．また，図には示していない

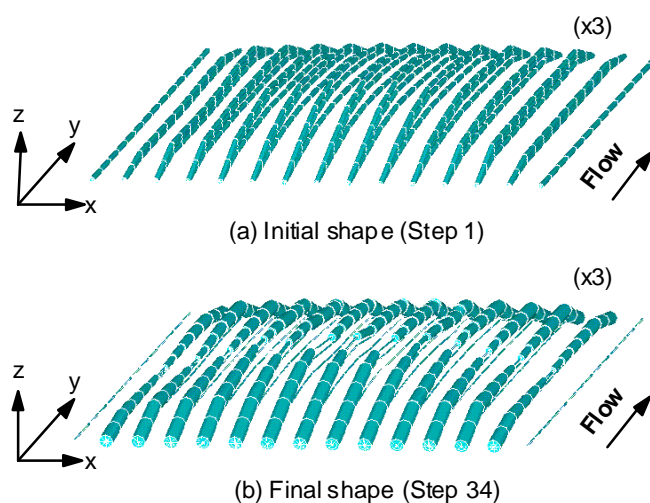


Fig. 5 Change in diameter of beam elements in the y-direction [12].

が  $x$  方向のビーム直径はすべて初期形状の半分以下の太さになり、モデルの剛性には大きく関与していないと思われる。また  $z$  方向のビーム直径に関してはおよそ 38%のビーム要素で初期形状よりも太くなり流れの上流部および下流部に太いビームが局在する傾向が得られた。応力が高い要素の剛性を増すというアルゴリズムで解析を行った結果、実験結果と類似した傾向が得られたことから細胞骨格の再構築もまた応力集中が発生する箇所で活発に行われていることが予想される。

#### 4 結言

本研究では、細胞骨格構造の再構築に着目し構造最適化アルゴリズムを導入した流体構造連成解析を行った。計算における細胞骨格の再構築の様子は実験において流れ方向にストレスファイバーが発達した現象と対応するものであったが、細胞の高さの減少は実験系における高さの減少と比較すると変化量はわずかである。本解析の有限要素モデルは単一の細胞をモデル化しており、細胞境界の変位を拘束したために形状の変形が制限されてしまった可能性がある。しかしながら、本研究で提案した新たな最適化アルゴリズムにより細胞骨格の再構築現象が再現できたことは非常に有用である。

#### 参考文献

- [1] M.J. Levesque, R.M. Nerem, The elongation and orientation of cultured endothelial cells in response to shear stress, ASME J. Biomech. Engng., 107, 341-347, 1985.
- [2] N. Kataoka, S. Ujita, M. Sato, Effect of flow direction on the morphological responses of cultured bovine aortic endothelial cells, Med. Biol. Engng. Comp., 36, 122-128, 1998.
- [3] K. Ookawa, M. Sato, N. Ohshima, Changes in the microstructure of cultured porcine aortic endothelial cells in the early stage after applying a fluid-imposed shear stress, J. Biomech., 25, 1321-1328, 1992.
- [4] P.R. Girard, G. Helmlinger, R.M. Nerem, Chap.6 Shear stress effects on the morphology and cytomatrix of cultured vascular endothelial cells: In physical forces and the mammalian cell, Academic Press, 193-222, 1993
- [5] R.L. Satcher Jr., S.R. Bussolari, M.A. Gimbrone Jr., C.F. Dewey Jr., The distribution of fluid forces on model arterial endothelium using computational fluid dynamics, ASME. J. Biomech. Engng., 114, 309-316, 1992.
- [6] K.A. Barbee, T. Mundel, R. Lal, P.F. Davies, Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers, Am. J. Physiol., 268, 1765-1772, 1995.
- [7] T. Yamaguchi, Y. Yamamoto, L. Hao, Computational mechanical model studies on the spontaneous emergent morphogenesis of the cultured endothelial cells, J. Biomech., 33, 115-126, 2000.
- [8] T. Ohashi, H. Sugawara, T. Matsumoto, M. Sato, Surface topography measurement and

intracellular stress analysis of cultured endothelial cells exposed to fluid shear stress, JSME Intl. J. Series C, 43, 780-786, 2000.

[9] M. Sato, K. Nagayama, N. Kataoka, M. Sasaki, K. Hane, Local mechanical properties measured by atomic force microscopy for cultured endothelial cells exposed to shear stress, J. Biomech., 33, 127-135, 2000.

[10] D.P. Theret, M.J. Levesque, M. Sato, R.M. Nerem, The application of a homogeneous half-space model in the analysis of endothelial cell micropipette measurements, ASME J. Biomech. Engng., 110, 190-199, 1988.

[11] Y.C. Fung, Chap. 7 Bioviscoelastic solids: Biomechanics-mechanical properties of living tissues-second edition, Academic Press, 242-320, 1993.

[12] 清尾慎司, 大橋俊朗, 松本健郎, 佐藤正明, 構造最適化手法を用いた流れ負荷培養内皮細胞の形態変化と応力解析, 日本機械学会講演論文集, 00-35, 200-201, 2001.

[13] 畔上秀幸, 成長の構成則を用いた形状最適化手法の提案(静的弾性体の場合), 日本機械学会論文集 A 編, 54, 2167-2175, 1988.