

## 学位論文題名

血管内皮表面上におけるリポ蛋白の  
流速依存性濃縮現象に関する実験的検討

## 学位論文内容の要旨

本研究は、動脈硬化症の局在化機構に関して流体力学的観点より検討を行ったものである。

動脈硬化症は、コレステロールに富んだ粥状斑点の形成およびその終局的な硬化により血管壁の内膜の部分が異常に肥厚するという病変である。この血管病の発病並びに進展の第一の要因として、血中コレステロールの濃度が挙げられているが、ヒトにおける動脈硬化症は、それだけでは説明できないようなもう一つの特徴を持っている。それは、そのほとんどが比較的大きな動脈の分岐部や彎曲部など、流体力学的見地より見て血流の乱れやすい場所に局所的に発症・進展するということである。このことから血流の関与が強く示唆され、今日まで、30年以上の長きに渡ってさまざまな角度から研究が行われてきた。その結果、この血管病の局在化に流れによって誘発されるせん断応力、特に低壁せん断応力が最も深く関与していることが判明した。しかしながら、それが具体的にどのような役割を果たしているのかは未だ不明な点が多く、現在も、世界中の研究者がその機構の解明を目指して研究を続けているといった状況である。

著者が所属している研究分野でも早くからこの問題に関心を抱き、主に流体力学的観点から理論的・実験的検討を行ってきた。本論文は、動脈硬化症の局在化機構として、コンピュータ・シミュレーションによる血中リポ蛋白の血管壁への物質移動の理論的解析の結果に基づいて当研究分野の狩野および和田により提唱された仮説、すなわち「血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象」に関して、その真偽を検証する目的で行った一連の実験的研究の成果をまとめたものである。この仮説は、血管壁が血漿に対して半透性を有することによる一種の濾過作用により、血管内皮表面上でリポ蛋白の濃縮が起こり、その濃度が血管壁における水透過速度を変える血圧に比例し、流速、従って壁せん断速度、にほぼ逆比例して変化することから、血管系の全体を通じて血管内皮表面上におけるリポ蛋白の濃度が流れの状態、特に壁せん断速度の大小、に応じて局所的に異なった値になっており、そのためにコレステロールの血管壁への取り込みも局所的に異なり動脈硬化の局在化を招いているというものである。

本研究の目的は、上述の仮説を実験的に検証することであるが、不透明な血管内の、しかも、ごく壁近傍の流れの場で、動的な平衡状態において起こっているこの現象を、血管断面におけるリポ蛋白の濃度分布を直接測定して実証することは、現時点では全く不可能であり、したがって間接的な方法に頼らざるを得ない。そこで本研究では、培養血管内皮細胞単層および半透膜チューブを血管のモデルとして用い、その中に血漿蛋白またはそのモデルおよびトレーサとしての蛍光ポリスタイレン微粒子を含んだ培養液を生理的範囲内の流速および水透過速度で灌流し、管壁における水透過速度がリポ蛋白の壁面濃度に応じて変化することを利用して、その水透過速度が

流速によっても変化するか否かを調べたり、蛍光の強度を測定することにより壁面近傍におけるリポ蛋白のトレーサとしての蛍光ポリスタイレン微粒子の濃度が流速および水透過速度によって変化するか否かを調べることにより、この現象が生理的条件下において実際に起こりうるか否かを検討した。本論文は、全体として6章より構成されている。

第1章では、本研究を行うことの必要性、および研究の目的について述べた。

第2章では、本研究を始めるに至った背景、本研究で実験的に検証しようとした仮説「血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象」、およびそれを実験的に観察する際に必要となる壁近傍の分子濃度を測定する方法について述べた。

第3章では、血管壁のモデルとして多孔質フィルタ上に播種培養したウシ大動脈由来内皮細胞単層を用い、これを平行平板型流路の一部になるように装着し、循環システムを用いてウシ胎児血清またはリポ蛋白を含んだ培養液を37°C、一定圧力、定常流の条件下で流量を色々変化させて灌流し、内皮細胞単層表面におけるリポ蛋白の濃度におよぼす流速（壁せん断速度）の影響について検討を行った。その結果、灌流液中に巨大分子が存在しない場合には流速を変化させても水透過速度は全く変化しないが、血清やリポ蛋白を含んでいる灌流液を用いた場合には、灌流速度の変化に応じて水透過速度が可逆的に変化し、灌流速度が小さいほど、そして灌流液中の血清濃度、したがってリポ蛋白の濃度、が大きいほど、水透過速度が小さくなることがわかった。また、分子サイズの大きいリポ蛋白の方が分子サイズの小さいアルブミンよりも大きな変化を起こすことがわかった。以上の結果を水透過速度と細胞単層表面上における巨大分子の濃度との関係を用いて灌流速度と巨大分子の表面濃度との関係に置き換えると、壁せん断速度が小さいほど、そして、巨大分子のサイズが大きいほど、内皮細胞単層表面上における巨大分子の濃度が高くなっていることになり、生理的条件下において、内皮細胞単層上において確かにリポ蛋白の流速に依存した濃縮現象が起こることがわかった。

第4章では、透析用半透膜チューブを血管のモデルとして用いて第3章で行ったと同様の灌流実験を行った。その結果、内皮細胞単層を用いた場合と同様に、灌流液中に血漿蛋白やリポ蛋白が存在する場合にのみ、流速の変化に応じて管壁における水透過速度、したがって巨大分子の壁面濃度が可逆的に変化し、半透膜表面上でも細胞単層の場合と同様の流速に依存した巨大分子の濃縮現象が起こることがわかった。また、分子サイズの影響に関しても直径の大きいリポ蛋白の方がアルブミンよりもこの現象に大きな影響をおよぼすことがわかった。以上の結果より、先の内皮細胞単層を用いた流れの実験で観察された流速に依存した水透過速度の変化が内皮細胞の生理的機能によるものではなく、単なる物理的現象、すなわち、流速に依存したリポ蛋白の濃縮現象によるものであることが明らかになった。

第5章では、血管壁のモデルとして培養血管内皮細胞単層を、そして、リポ蛋白のモデル並びにトレーサとしてリポ蛋白とほぼ同じ大きさの蛍光ポリスタイレン微粒子を用い、第3章で行ったと同様の灌流実験を行い、細胞単層およびその近傍の灌流液におけるリポ蛋白の濃度変化を蛍光顕微鏡と光度測定装置により直接測定した。その結果、細胞単層近傍における蛍光微粒子の濃度が流速および灌流圧に依存して変化し、流速が小さいほど、そして灌流圧が大きいほど大きくなることがわかった。また、細胞単層近傍における蛍光微粒子の濃度にはほぼ比例して内皮細胞単層に取り込まれる微粒子の量も増大することがわかった。本研究で用いた蛍光微粒子は、低密度リポ蛋白と同程度の大きさであり、低密度リポ蛋白と同様の挙動を示すと考えられることから、生体血管内においても、ほぼ間違いなく、血管内皮表面上で本研究で観察されたと同様の低密度リポ蛋白の流速に依存した濃縮現象が起こっており、低密度リポ蛋白の濃度が血管内の流れの状

態に応じて局所的に異なっているものと推測された。

第6章では、本研究の結論および将来への展望を述べた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 狩 野 猛  
副 査 教 授 下 澤 楯 夫  
副 査 教 授 山 本 克 之  
副 査 教 授 河 原 剛 一

学 位 論 文 題 名

## 血管内皮表面上におけるリポ蛋白の 流速依存性濃縮現象に関する実験的検討

動脈硬化症は、コレステロールに富んだ粥状斑点の形成およびその終局的な硬化により血管壁の内膜の部分が異常に肥厚するという病変であり、そのほとんどが比較的大きな動脈の分岐部や彎曲部など、流体力学的見地より見て血流の乱れやすい場所に局所的に発症・進展するという特徴を持っている。本論文は、その局在化機構として、コンピュータ・シミュレーションによる血中リポ蛋白の血管壁への物質移動の理論的解析の結果に基づいて狩野および和田により提唱された仮説、すなわち「血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象」、に関して、その真偽を検討する目的で行った一連の実験的研究の成果をまとめたものである。この仮説は、血管壁が血漿に対して半透性を有することによる一種の濾過作用により血管内皮表面上でリポ蛋白の濃縮が起り、その濃度が血管壁における水透過速度を変える血圧に比例し、流速、従って壁せん断速度、にほぼ逆比例して変化することから、血管系の全体を通じて血管内皮表面上におけるリポ蛋白の濃度が流れの状態、特に壁せん断速度の大小、に応じて局所的に異なった値になっており、そのためにコレステロールの血管壁への取り込みも局所的に異なり動脈硬化の局在化を招いているというものであるが、不透明な血管内の、しかも、ごく壁近傍の流れの場で、動的な平衡状態において起こっているこの現象を、血管断面におけるリポ蛋白の濃度分布を直接測定して実証することは、現時点では全く不可能である。そこで本研究では、まず、間接的な方法として、管壁における水透過速度がリポ蛋白の壁面濃度に応じて変化することを利用して流れの影響を調べることを考え、血管壁のモデルとして多孔質フィルタ上に播種培養したウシ大動脈由来内皮細胞単層を用い、これを平行平板型流路の一部になるように装着し、循環システムを用いてウシ胎児血清またはリポ蛋白を含んだ培養液を 37°C、一定圧力、定常流の条件下で流量を色々

変化させて灌流し、内皮細胞単層表面におけるリポ蛋白の濃度におよぼす流速（壁せん断速度）の影響について検討を行った。その結果、灌流液中に巨大分子が存在しない場合には流速を変化させても水透過速度は全く変化しないが、血清やリポ蛋白を含んでいる灌流液を用いた場合には、灌流速度の変化に応じて水透過速度が可逆的に変化し、灌流速度が小さいほど、そして灌流液中の血清濃度、したがってリポ蛋白の濃度、が大きいほど、水透過速度が小さくなることを見いだした。また、分子サイズの大きいリポ蛋白の方が分子サイズの小さいアルブミンよりも大きな変化を起こすことがわかった。以上の結果を水透過速度と細胞単層表面上における巨大分子の濃度との関係を用いて灌流速度と巨大分子の表面濃度との関係に置き換えると、壁せん断速度が小さいほど、そして、巨大分子のサイズが大きいほど、濃度が高くなっていることになり、理論的検討の結果示唆されたりポ蛋白の流速に依存した濃縮現象が生理的条件下で培養血管内皮細胞単層上において起こることを実験的に確認した。

次に、透析用半透膜チューブを血管のモデルとして用いて先に行ったと同様の灌流実験を行った。その結果、内皮細胞単層を用いた場合とほとんど同様の現象が起こることを認め、先の内皮細胞単層を用いた実験で観察されたりポ蛋白の流速に依存した濃度変化が内皮細胞の生理的機能によるものではなく、単なる物理的現象、すなわち、流速に依存したりポ蛋白の濃縮現象によるものであることを明らかにした。

最後に、より直接的な方法として培養血管内皮細胞単層およびリポ蛋白とほぼ同じ大きさであり、したがって低密度リポ蛋白と同様の挙動を示すと考えられる蛍光ポリスチレン微粒子を用いて灌流実験を行い、細胞単層およびその近傍の灌流液におけるリポ蛋白の濃度変化を蛍光顕微鏡装置により直接測定した場合にも細胞単層近傍において蛍光微粒子の流速および灌流圧に依存した濃縮現象が起こることを確認するとともに内皮細胞単層に取り込まれる微粒子の量が細胞単層近傍における蛍光微粒子の濃度にほぼ比例して増大することを明らかにした。

これを要するに、本論文は、動脈硬化症の局在化機構として提唱されている理論的仮説、すなわち「血管内皮表面上におけるリポ蛋白の流速依存性濃縮現象」が生理的条件下で起こることを確認づける多くの新知見を得たものであり、生理工学および血管病理学に対して貢献するところ大なるものがある。よって著者は、北海道大学博士（工学）の学位を授与される資格があるものと認める。