

学位論文題名

走査型触覚顕微鏡による生体組織の微細弾性構造観察および新規計測機能の開発に関する研究

学位論文内容の要旨

生体組織の機能解明、また、人工組織体の完成度の評価において、力学的特性の計測は基本的かつ重要なアプローチ方法である。古くから、生体組織の力学的特性は、主に引っ張り試験や内圧負荷試験などの強度試験を行い、荷重と変形量の関係を調べることで行われてきた。近年では、原子間力顕微鏡や超音波検査技術などの発展により、細胞単体や分子レベルの力学的特性を明らかにする手法が提案され、ナノレベルでの力学的特性の分析や評価が可能となっている。しかしながら、生体組織を構成する細胞や細胞外マトリクス線維が織りなす構造に着目した、いわゆる線維構造レベルの力学的特性の分布観察は未だ明らかにされていない点が多い。これは、線維構造レベルの計測には、各線維を識別するためのマイクロメータレベル以下の空間分解能と、線維の構造を把握するためのサブミリメートルレベル以上の観察領域の両立が必要であることに起因する。一方、これまでに細胞単体から臓器レベルまでの幅広い範囲で生体組織の弾性率分布を明らかにできる走査型触覚顕微鏡（SHM）が開発されている。SHM はマイクロメータレベルの先端径のガラス振動針が試料表面に軽く押し込まれた際の振動周波数の変化から弾性率を計測し、2次元走査を行いながらこの押し込み動作を試料表面の各測定点で行うことで、試料の表面形状と弾性率分布を精密かつ定量的に評価できる。そこで本研究では、SHM を用いて、生体組織の線維構造レベルでの弾性率分布計測を動脈壁を例に行い、動脈壁の構成線維であるエラスチンとコラーゲンの力学的役割を明らかにするとともに、SHM の人工組織体の力学的評価への応用として、生体内で組織工学的な技術に基づいて作製された人工血管（バイオチューブ）、人工心臓弁（バイオバルブ）、人工角膜（バイオシート）を例に、移植前後におけるマイクロ領域での弾性率分布を精密に評価することを目的とした。また、本研究では、SHM を用いた新規計測機能の開発として、微細領域での密度分布観察と粘着性計測に取り組んだ。

本論文は、序論および総括を含む7章より構成されている。

第2章では、心臓付近から腸骨付近までに至るイヌ大動脈壁の部位による微細弾性構造の違いを、大動脈壁の中膜ほぼ全層におけるSHM測定から明らかにした。コラーゲンはエラスチンに比べ非常に硬い線維として知られているが、低圧状況下の動脈壁内のコラーゲンは弛緩した状態に存在しているため、無圧状態で行ったSHM測定において、コラーゲンリッチな領域の弾性率はエラスチンリッチな領域の弾性率の半分以下であった。部位間での平均弾性率は、胸部大動脈で最も高く、心臓付近と腸骨付近の大動脈両端で低かった。これは典型的な血管強度試験である引っ張り試験における低圧域の結果と類似しており、SHM測定によって得られたミクロな特性の平均がマクロ試験で得られた特性と相関していることを示し、本測定の信頼性の高さが明らかとなった。部位間の弾性率の変化傾向は、エラスチン線維量の変化傾向と類似しており、無圧下において、エラスチン量が血管の弾性率に深く影響しており、コラーゲンは力学的にはほぼ影響していないと結論づけられた。

第3章では、生理的な伸張状態にあるイヌ大動脈壁の弾性構造を観察するとともに、低圧から超高

圧までの各伸張状態における弾性構造の違いを比較した。伸張ひずみは、リング状の血管を切り開き作製した直方体の血管試料を一樣に引っ張る、もしくは、擬似的な内圧を加えるため血管リングの内側にシリコン棒を挿入することで加えた。両法とも、各伸張ひずみにおける平均弾性率はほぼ同じ値を示し、その増加傾向はマクロ引っ張り試験と類似していた。両法とも、無圧状態から生理圧域までは得られた弾性構造に顕著な違いは見られなかったが、高圧域においては、一樣に引っ張った血管試料では半径方向に弾性率の変化があまりなかったのに対し、シリコン棒の挿入によって擬似内圧を加えた血管試料では内腔面側から外側面側に向かうにつれ弾性率が減少した。エラスチンリッチな領域の弾性率は無圧状態から超高圧状態に至るまで伸張ひずみの増加にほぼ比例して増加したが、コラーゲンリッチな領域の弾性率は生理圧以下ではほとんど変化せず、高圧域以上で顕著に増加した。本測定により、生理的な圧力が加えられた状態での動脈壁内の弾性構造のマイクロレベルでの可視化を初めて実現し、その結果、生理圧域においてはエラスチン線維が主に大動脈の耐圧性を担っており、コラーゲン線維は極めて高圧な状態を除き大動脈壁の力学的特性にあまり影響していないと考えられた。

第4章では、SHMを人工組織体の力学的適合度の評価に応用するため、生体内で組織工学的に作製された人工血管、人工心臓弁、人工角膜の移植前後における弾性構造の変化を観察した。作製された組織体は、厚みや固定処理の違いにより移植前の弾性率は異なり、移植部の生体組織とも弾性率が異なっていたが、いずれの組織も2～3カ月の移植によって、移植部周辺の生体組織とほぼ同程度まで弾性率が近づいた。また、無秩序な弾性構造だった人工組織体は、移植によって、移植部周辺の生体組織に類似する弾性構造が形成されていた。これらの人工組織体が、移植によってマクロにもミクロにも周辺の生体組織が有する力学的特性に近づいていくことを実証し、SHMによって人工組織体のマイクロメカニクス的な評価法を提案することができた。

第5章では、表面形状、弾性率分布観察に続くSHMの新規計測機能の開発として、密度測定の可能性について検討し、大動脈壁の微細密度構造の可視化を試みた。その結果、先端直径が5 μm 程度のガラス針を用い、ガラス針の2次、3次共振周波数近傍を測定周波数にそれぞれSHM測定を行い、両周波数での測定で得られた周波数変化率の差を求めることで、表面形状と弾性率分布観察の機能を損なわずに試料表面の密度を評価可能であることが、寒天-シリコン間の密度差を計測することで明らかとなった。この手法を用いてイヌ大動脈壁の観察を行うと、エラスチンリッチな領域はコラーゲンリッチな領域よりも高密度な領域であることが明らかになった。本測定により、生体組織のマイクロレベルでの密度分布の可視化を初めて実現した。

第6章では、SHMの新規計測機能の開発として、粘着性の測定可能性について検討した。段階的に粘着性が異なるシリコンゴムを試料にSHM測定を行い、一般的なマクロ粘着性評価試験であるローリングボールタック試験、プローブタック試験と比較した。その結果、粘着性に富む試料ではガラス針を引き抜く際に試料がすぐに剥離しないため、SHM測定を行った際の押し込み時と引き抜き時の周波数変化に要した時間の差が、試料表面の粘着性をよく反映することがわかり、マイクロメートルレベルの空間分解能で粘着性分布を定量的に評価できる可能性が示唆された。本測定はSHMにおける局所的な粘着性の測定可能性を確かめる基礎的検討であったが、あらかじめガラス針に生体分子を修飾しておくことで、試料表面の生体分子や細胞との親和力を定量的に評価できると考える。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	高 木	陸
副 査	客員教授	中 山	泰 秀
副 査	教 授	坂 口	和 靖
副 査	准教授	田 島	健 次
副 査	教 授	田 口	精 一

学 位 論 文 題 名

走査型触覚顕微鏡による生体組織の微細弾性構造観察および新規計測機能の開発に関する研究

生体の力学的計測は、臓器や組織の機能解明、病因の究明、治療、診断などにおいて基本的で重要なアプローチである。生体組織の力学的特性は、古くから引っ張り試験や内圧負荷試験などマクロ的に調べられてきた。近年では、原子間力顕微鏡 (AFM) や超音波顕微鏡などが開発され、細胞や分子レベルの力学的特性が報告されている。しかしながら、生体組織内部のマイクロレベルの力学的特性を組織個体のマクロの広い領域で観察できる装置はなく、組織工学や再生医療工学分野を中心に望まれている。

一方、著者らの研究グループにおいて、生体試料表面の弾性率分布をマイクロレベルの高精度でイメージングできる日本発世界初の走査型触覚顕微鏡 (SHM: Scanning haptic microscope) が開発されている。SHM はマイクロメータレベルの先端径のガラス振動針プローブが試料表面に軽く触れた時に生じる振動周波数の変化から弾性率を計測し、それを二次元表面で走査しながら繰り返すことで、定量的な試料表面の形状像と弾性率分布像を同時に得ることができる。

そこで本研究では、SHM 計測を用いて、大動脈組織をサンプルとして、1) 組織内に含まれる細胞外マトリックスの観察と組織間の物性の差異の究明、2) 生体内類似拍動環境下での物性評価を第一の目的とした。また、再生医療工学分野への応用として、3) 移植自己組織体の生着度の評価方法の確立を第二の目的とした。さらに、生体組織の 4) 密度分布イメージングの取得法や 5) マイクロ粘着性の計測法など、SHM の高機能化技術の確立を第三の目的とした。

本論文は、第一章から第七章までで構成されており、以下にその概要を記す。

第一章では、現在の生体組織の力学的計測技術に関して概説し、従来技術の問題点、マイクロ物性計測の必要性、重要性について概述した。また、本研究において基盤となる SHM の開発状況を通じて特徴と機能について説明し、本研究の目的を記した。

第二章では、心臓付近から腸骨付近までに至るイヌ大動脈壁の部位による微細弾性構造の違いを、大動脈壁の中膜のほぼ全層における SHM 測定から明らかにした。平均弾性率は、胸部大動脈でも高く、心臓付近と腸骨付近の大動脈両端で低いことが分かった。また、各部位に共通して、大動脈内のコラーゲンリッチな領域の弾性率はエラスチンリッチな領域の弾性率の半分以下であることが分かり、血管の弾性率はほぼエラスチンによって決定されることを明らかとした。

第三章では、低血圧から高血圧までの拍動模擬状態に連動した血管壁内のマイクロ弾性構造の変化が詳細に調べられた。模擬には、輪切り血管サンプルの内腔面に所定径のシリコン円柱を挿入することにより行われた。模擬拍動収縮時ではサンプル内の弾性率分布はほぼ一様であったが、拡張時には内腔面での高弾性率化を認め、従来の予想が実証された。また、生理的な血圧変動域の全体を通じて、第二章での無圧状態と同様に、血管の弾性はほぼエラスチンに依存することを明らかとした。生理的範囲内において、低圧域はエラスチンが、高圧域はコラーゲンが弾性を担っていると推定されていた従来の定説を覆す新たな知見を見出した。コラーゲンの弾性は非生理的な過剰な圧への耐性に寄与し、破裂など異常時に対処する役割を担っていることが示唆された。

第四章では、生体内で組織工学的に作製された自己組織からなる再生医療組織体であるバイオチューブ人工血管、バイオバルブ人工心臓弁、バイオシート人工角膜の移植前後における弾性構造の変化が観察された。作製された組織体は、厚みや固定処理の違いにより移植前の弾性率は異なり、移植部の生

体組織とも弾性率が異なっていたが、いずれの組織体も 2~3 カ月の移植によって、移植部周辺の生体組織とほぼ同程度まで弾性率が近づくことを実証した。また、無秩序な弾性構造だった組織体は、移植によって、移植部周辺の生体組織に類似する弾性構造が形成されていたことも明らかとした。SHM の再生組織のマイクロメカニクスのな生着評価法としての有用性を示した。

第五章では、表面形状、弾性率分布観察に続く SHM の新規計測機能の開発として、密度計測の可能性を見出し、大動脈壁の微細密度構造のイメージングに世界で初めて成功した。先端直径が $5\ \mu\text{m}$ 程度のガラス針を用い、ガラス針の二次、三次共振周波数近傍を測定周波数にそれぞれ SHM 測定を行い、両周波数での測定で得られた周波数変化率の差を求めることで、表面形状と弾性率分布の観察機能を損なわずに試料表面の密度イメージングを実現した。イヌ大動脈壁をサンプルとすると、エラスチンエラスチンリッチな領域が高密度であることが見出され、第二章、第三章で見出されたコラーゲンリッチな領域の低弾性率が低密度によることを明らかにした。

第六章では、SHM のさらなる新規機能化として、超微細領域での粘着性計測に取り組んだ。段階的に粘着性が異なるシリコーンゴムを試料に SHM 測定を行い、一般的なマクロ粘着性評価試験であるローリングボールタック試験、プローブタック試験と比較された。SHM 測定を行った際の押し込み時と引き抜き時の周波数変化に要した時間の差が、試料表面の粘着性をよく反映することを見出し、マイクロメートルレベルの空間分解能での粘着性分布の定量的な計測に成功した。あらかじめガラス針に生体分子を修飾しておくことなどで、細胞との親和力の定量的な計測などの発展が期待された。

第七章では、本論文の内容を総括し、今後の展望をまとめた。
これを要するに、生体組織を対象とした新たな顕微鏡システムの用途と応用性を展開させただけに留まらず、再生医療工学分野における評価基盤技術を開発し、また血管組織内部の生体模擬環境下でのマイクロ弾性構造を解明するなど重要な知見を与え、生体工学、再生医療工学、計測工学分野の進展に貢献するところ大である。

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。