

## 画像解析による等時相線図を用いた

## 培養毛細血管網構築の可視化に関する研究

## Study on the visualization of a cultured capillary network construction

## by using isochronal map

○ 外處侑 (東京電機大学)      幡多徳彦 (東京電機大学)      野中一洋 (東京電機大学)  
野口展士 (東京電機大学)      荒船龍彦 (東京電機大学)      本間章彦 (東京電機大学)

福井康弘 (東京電機大学)      舟久保昭夫 (東京電機大学)

Susumu TODOKORO, Tokyo Denki University  
Norihiko HATA, Tokyo Denki University  
Kazuhiro NONAKA, Tokyo Denki University  
Hiroo NOGUCHI, Tokyo Denki University  
Tatsuhiko ARAFUNE, Tokyo Denki University  
Akihiko HOMMA, Tokyo Denki University  
Yasuhiro FUKUI, Tokyo Denki University  
Akio FUNAKUBO, Tokyo Denki University

**Abstract:** In the 3D cell culture, it is necessary to construct optimum capillaries, which supply oxygen and nutrients for the cells. We already reported the blood capillaries had been found that the diameter formed at 5-20 $\mu\text{m}$  in optimum flow rate culture condition with in 3D scaffold. The purpose of this study is the visualizing perfusion liquid flow in 3D scaffold, and it is to evaluate the process of the capillary network constructions in 3D scaffold. A small vascular graft that created 0.4mm holes at 5mm distant in vascular wall was sandwiched between fibrous scaffold sheets. The visualizing particles were flowed to scaffold. The perfusion liquid flow were captured as visualizing particle flow by using CMOS video camera (mv-1024-dv)/Photon focus). The captured flow images were processed as Isochronal Map in offline and were compared with cultured capillary image measured by phase contrast microscope.

**Key Words:** visualization, capillary network, isochronal map

## 1. 研究背景と目的

三次元的構造を有する足場材での細胞培養において、組織内部に酸素、栄養が行き渡らず細胞が死に至る可能性がある。そのため、足場材の中に毛細血管を適切に構築することが重要である。我々は既報にて、足場材である繊維性スキャフォールドシートで挟んだ人工血管に、培地を灌流させながらマウス血管内皮腫様細胞を培養し、三次元的に直径 5-20  $\mu\text{m}$  の毛細管の形成を確認した。ただし、毛細管は繊維性スキャフォールド中に様々な箇所へ誘導され、明確な形成要因は定量的に確認されていない。毛細血管を構築する一つの要因として、流れずり応力に対する内皮細胞の応答が挙げられる<sup>(1)</sup>。本研究では、三次元スキャフォールド内に形成された毛細血管網の構築プロセスを明らかにするため、流体解析を用いた人工血管からのスキャフォールド内への培地の流れの可視化を目的とする。

## 2. 実験方法

流体の供給路として人工血管を作製し、流体の流出部として、人工血管の壁面に 5mm 間隔で直径 0.4mm の微小孔を開けた。作製した人工血管を繊維性スキャフォールドシートで挟み、光造形機で作製された培養プレート上に設置、培養プレートを培養シャーレに固定した。そして、シャーレ側面に inlet、シャーレ上面に outlet を設け、ローラーポンプを接続し灌流回路を作製した。培地の流れを可視化す

るため、培地の代わりにサイズ約  $\phi 0.2\sim 0.3\mu\text{m}$  の微小な可視化粒子を灌流溶液に添加し、回路内を灌流させた。この可視化粒子の流れを位相差顕微鏡に設置した CMOS カメラ (Photon focus 社, mv-1024-dv) を用いて、細胞播種実験においてスキャフォールドに毛細血管が形成された箇所と同一の箇所の近傍を計測した。そして、取得した画像内の流体前面のみを抽出し、画像を重ね合わせ、等時相線図を作製することで、培地の流れの可視化を行った。細胞播種実験 n=4, 可視化実験 n=4 で比較し、培地の流れと毛細血管網の形成の関係性を調べた。

Fig. 1 に可視化実験で構成した灌流回路、Fig. 2 にスキャフォールドシート付近の拡大図を示す。

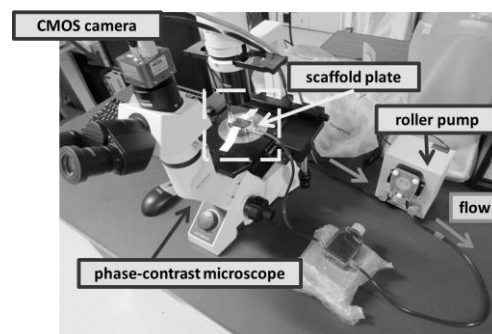


Fig. 1 Visualization experimental circuit

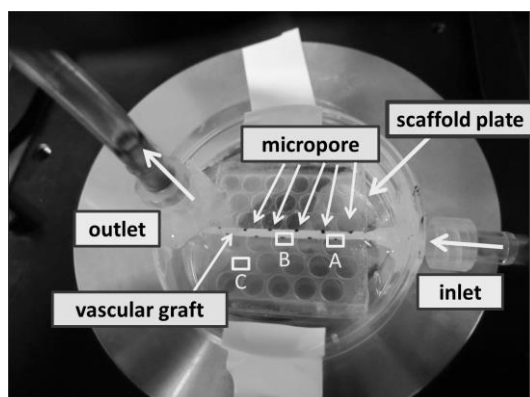


Fig. 2 The enlarged view of scaffold plate

### 3. 結果

Fig. 3 に、Fig. 2 の A 点 (inlet 側から一番目の微小孔) 近傍の等時相線図を示す。

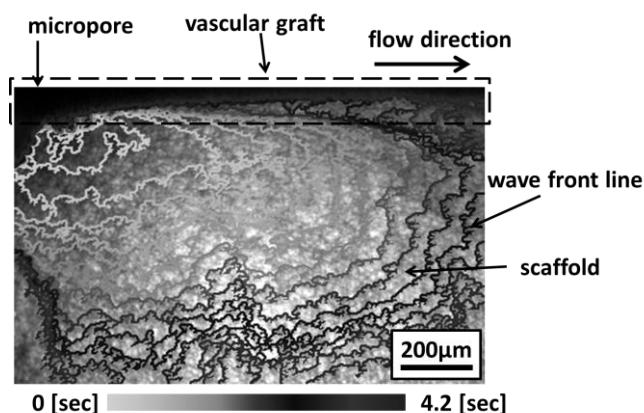


Fig. 3 Isochronal map

作製した等時相線図より、人工血管から約 0.8mm の範囲では、微小孔からの距離や人工血管の流れの方向に比較的依存して約 0.2~0.8mm/sec と培地の流速に差があることを確認することが出来た。

Fig. 4 に、Fig. 2 の B 点、C 点において作製した等時相線図と、同一の箇所で作成された毛細血管の画像を比較した図を示す。

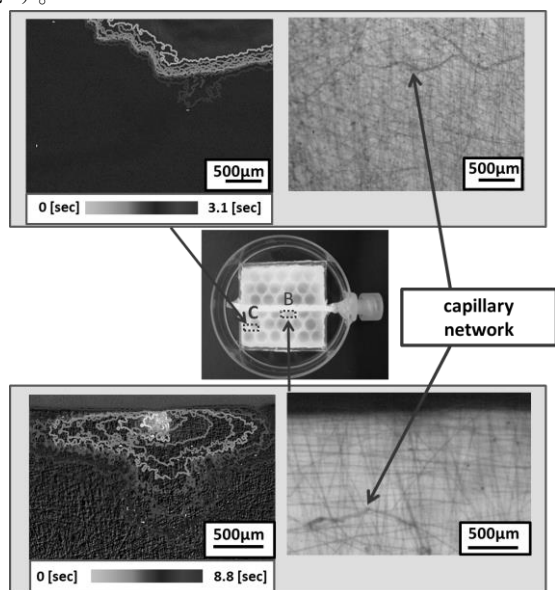


Fig. 4 Comparative images

### 4. 考察

Fig. 3 より、画像解析による等時相線図を用いた本手法により、人工血管からスキャフォールド内への培地の流れを二次元的に、かつ定量的に可視化することが出来た。また、Fig. 4 より、可視化粒子を流した環境において、灌流溶液の流速が約 0.1~0.6mm/sec とポンプからの流入速度である inlet 側における流速 1.5ml/min に比べると、ほぼ停滞している箇所の近傍で、細胞を播種したスキャフォールドでは多くの毛細血管が形成されていた。よって、人工血管からスキャフォールド内への培地の流速が、毛細血管の形成に寄与している可能性が示唆された。

### 5. 結論

本実験では、培地の代わりに可視化粒子を用いて灌流実験を行い、取得した画像から画像解析により等時相線図を作製することで培地の流れの可視化を行った。得られた等時相線図により、定量的に培地の流れを可視化することが出来た。また、等時相線図を作製した箇所と、同一箇所で作成された毛細血管を撮影した画像を比較すると、培地の流れが停滞しているところに毛細血管が多く形成されていることを確認することが出来た。よって、本手法により、毛細血管を形成した要因の一つと考えられる培地の流れを二次元的に、かつ定量的に評価することが可能であることが示唆された。

### 6. 参考文献

- (1)山本希美子, 安藤謙二, 血管内皮細胞のプリセプターを介した流れずり応力感知機構, 日本薬理学誌, vol. 124, pp. 319-328, 2004

### 7. 謝辞

本研究の一部は、平成 20~24 年度文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事後 (S0801023) の研究費によって支援された。また、文部科学省科学研究費補助金 (15650100,18650127,23300170) によって支援された。