

培養内皮細胞の高分子物質取り込みに及ぼす壁せん断応力の影響*

工藤 奨^{*1}, 池澤憲治^{*2}, 松村伸治^{*3}
池田満里子^{*4}, 岡浩太郎^{*5}, 谷下一夫^{*5}Effect of Wall Shear Stress on Macromolecule Uptake
into Cultured Endothelial CellsSusumu KUDO, Kenji IKEZAWA, Shinji MATSUMURA,
Mariko IKEDA, Kotaro OKA and Kazuo TANISHITA

The purpose of this study is to reveal macromolecule uptake route (intercellular or intracellular) in the endothelial cell layer, and to examine the effect of wall shear stress on the uptake. After 48 hour exposure to shear stress, the endothelial cell layer on coverslips were incubated at 37°C for 60 minutes in PBS containing tetramethylrhodamine isothiocyanate conjugated albumin (TRITC-albumin). Thereafter, the uptake of albumin and the shape of endothelial cells were observed by a confocal laser scanning microscope (CLSM). Albumin is found in intracellular region, not in intercellular region. The albumin uptake depends on imposed shear stress. At 10 dyn/cm², the albumin uptake showed a 1.3 folds increase. The albumin uptake decreases with increasing shear stress, and minimum uptake is quarter of the control value at 60 dyn/cm². This shear dependence of uptake is a unique feature of the cell and may play a key role for the controlling mechanism of endothelial cells.

Key Words: Biological Engineering, Shear Flow, Bio-Fluid Mechanics, Endothelial Cell, Macromolecule Uptake, Albumin

1. はじめに

アテローム性動脈硬化症は、コレステロールの輸送体の一つである血中の low density lipoprotein (LDL) が内皮細胞下に浸潤した単球由来のマクロファージに酸化 LDL の形で取り込まれていることによりマクロファージが泡沫化し、平滑筋の増殖を伴うことから進行する疾病である。近年では内皮細胞においても酸化 LDL のレセプターが同定されその関与が示唆されている⁽¹⁾。ところで、最初期の段階では、泡沫化したマクロファージが発現する前に LDL の内皮細胞下への沈着が生じるという報告がある⁽²⁾。また、アテローム性動脈硬化症発生部位は大動脈曲がり部の内側や分岐部側壁や狭窄部の直後など、平均壁せん断応力の低い部位に好発することが知られており^{(3)~(5)}、病変部位の局在性から血液の流れとの関連が指摘されている。その様な部位ではコレステロール沈着部位とア

ルブミン沈着部位の一致が観測されており⁽⁶⁾、また内皮細胞の horse radish peroxidase (HRP) 透過性亢進も観測されている⁽⁷⁾。

血管内皮細胞は血管内面を一面に覆っており、常に血流によるせん断応力の影響を受けており、内皮細胞に流れを負荷すると細胞形態や機能が変化する⁽⁸⁾。特に物質取り込みや⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾、物質透過⁽¹¹⁾に関しては、せん断応力負荷により亢進することが報告されており、アテローム性動脈硬化症との関連が示唆されている。

しかし、従来の報告では、細胞層のどの部位に取り込まれたのか、それがせん断応力の影響を受けどう変化するのかについての情報が少ない。そこで本研究では、細胞層内への高分子物質の分布及び取り込み量と主要取り込み経路を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観測し、それがせん断応力によりどの様に影響されるかを検討した。高分子物質のトレーサーとしては *in vivo* で LDL の沈着部位が一致しているアルブミンを使用した。

2. 実験方法

2.1 細胞培養 ブタ胸部大動脈より、Shasby ら⁽¹²⁾の方法に準じて内皮細胞を採取した。内皮細胞を剝離するために血管を縦方向に切り開き、メスを用

* 原稿受付 1997年5月28日。

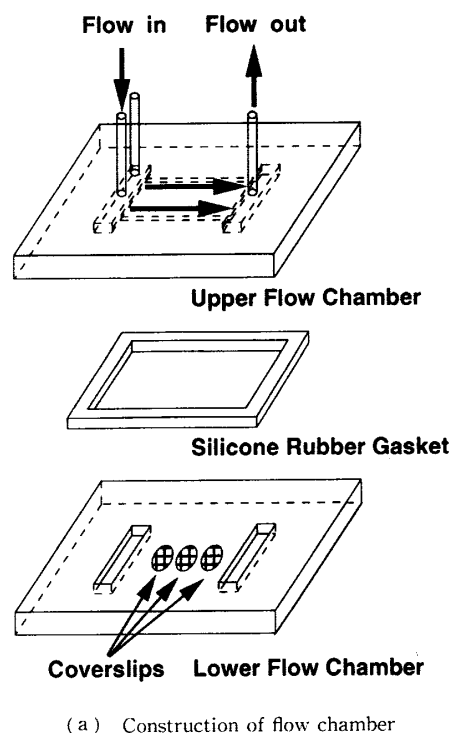
^{*1} 正員、慶應義塾大学大学院。(〒223 0061 横浜市港北区日吉3-14-1)。^{*2} 慶應義塾大学大学院。^{*3} 慶應義塾大学生物学教室(現:浜松医科大学)。^{*4} 慶應義塾大学生物学教室。^{*5} 正員、慶應義塾大学理工学部。

いて血管の内側を緩やかに剥ぎ取った。メスに付着した細胞を10%ウシ胎児血清(JRH Biosciences)と抗生物質(Antibiotic-Antimycotic, GIBCO)を含んだ培養液(Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), GIBCO)中で攪拌し、25 cm²のフラスコに播種した。細胞がコンフルエントになってから1:4の比率で継代培養をおこなった。継代数5から9代の細胞をカバーガラス上に播種し、実験に使用した。内皮細胞は単層敷石状の形態的な特徴及び内皮細胞に特異的に取り込まれるアセチル化LDL(low density lipoprotein, acetylated, DiI complex (DiI-Ac-LDL), Molecular Probes, Inc.)の取込により同定した⁽¹³⁾。

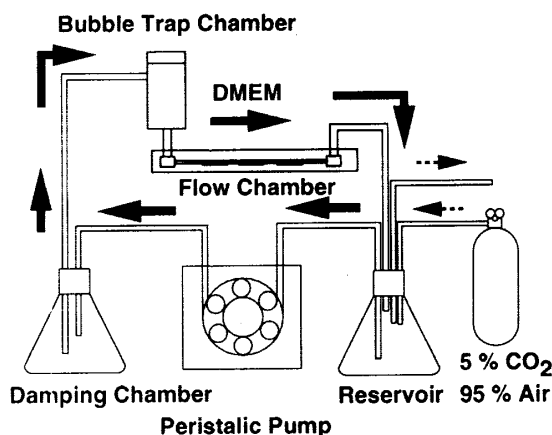
2・2 取り込みに使用する蛍光標識したアルブミンの精製 アルブミンの取り込みは tetramethyl rhodamin conjugated albumin (TRITC-albumin) (Molecular Probes, Inc.)をトレーサーとして観察した。このTRITC-albumin中の遊離TRITCを検出するために、多孔質の充填剤(Sephadex G50, Pharmacia Biotech)を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを行った。またTRITC-albuminを遊離TRITCと分離精製するために、限外濾過フィルタ(CENTREX UFB-C 30, IWAKI)を用いて4000×gで1時間遠心分離を3回繰り返した。これをリン酸緩衝液(Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (PBS), GIBCO)に1 mg/mlで溶解し、無標識のアルブミンを加え、アルブミン濃度を4 mg/mlとした(溶液A)。

さらに、3回目の遠心分離後に遊離TRITC溶液を回収し、無標識アルブミンを加え4 mg/mlとした(溶液B)。この溶液を内皮細胞に取り込ませ、バックグラウンドのためのコントロールとした。

2・3 せん断応力負荷装置及び方法 洗浄をおこなったφ22 mmのカバーガラス上に内皮細胞を播種し、コンフルエントを確認後図1(a)に示した流路内に置いた。せん断応力値の設定を広く設けるために平行平板型流路を採用し、その寸法は高さ0.2 mm、幅20 mm、長さ90 mmとした。この平行平板型流路を図1(b)に示す装置とつなげ、流れを負荷した。また、流路内はすべて培養時と同じ10%ウシ胎児血清を含んだDMEMで満たした。ローラーポンプの脈動成分の除去には空気層が十分にあるリザーバーを用いた。また、リザーバー内にCO₂と空気の混合気体(5% CO₂-95% Air Balance)を通気することにより、回路内のpHを一定に保った(pH 7.4)。また、ローラーポンプ以外のすべてを恒温槽内に設置することにより流路内の温度を37°Cで一定とした。この状態で48時間せん断応力を負荷した。



(a) Construction of flow chamber



(b) Schematic diagrams of the flow circuit

Fig. 1

2・4 細胞内へのTRITC-albuminの取り込み

せん断応力負荷48時間後に、流路からカバーガラスを取り外し、溶液A中で60分間インキュベートした。その後、PBSで3回洗浄し、2%パラホルムアルデヒドで2分間固定後、さらにPBSで3回洗浄した。カバーガラスはシリコン製スペーサーをおいたスライドガラス上にPBSとともにマウントし、観察した。バックグラウンド補正のために、溶液B中で60分間インキュベートし、上述と同様な処理を施した試料を用意した。

2・5 共焦点レーザー顕微鏡による観察及び解析 蛍光像は、対物レンズ(63×(NA 1.4)Plan-*apo*, Nikon)を使用した倒立型顕微鏡(TMD 300, Nikon)

を組み込んだ共焦点レーザー顕微鏡(MRC-600, Bio Rad)を使用し, コンピュータに取り込んだ。光源として 25 mW アルゴンイオンレーザを用いた。

各カバーガラス上の $160 \times 240 \mu\text{m}$ の領域 5 ケ所に関して測定をおこなった。各領域において垂直方向に $1 \mu\text{m}$ 間隔で 11 枚の連続断層像を取り込んだ。また, 各像は褪色を防ぐためにレーザー光入力部に 10%ND フィルターを使用した。また, スキャンスピードは 512 line/sec としノイズ除去のため 4 回走査の平均像を取り込んだ。

取得した蛍光像は, コンピュータ(Macintosh Quadra 840 AV, Apple Computer)上で画像解析用ソフト NIH-image 1.60 を使用して解析した。TRITC-albumin の取り込みは Richik ら⁽¹⁴⁾の方法に準じて解析した。連続断層像を積算し全フォーカスにピントが合った像を合成し, この像を解析した。蛍光画像は輝度の明るさを黒を 0 白を 255 とした 256 階調のグレースケールで表示した。また, 溶液 B を取り込ませた試料の全輝度を 99.99%カットする値を閾値として定め, その値以下をバックグラウンドとした。各実験間でのばらつきを補正するために同一条件で静置培養した試料からの蛍光強度を同様な方法で求めその平均値を 1 と規格化した。また, 各せん断応力値で得られた結果に対して静置条件と比較し, Mann-Whitney U 検定をおこなった。

3. 結 果

3.1 遊離 TRITC の TRITC-albumin の取り込みに及ぼす影響 Sephadex G 50 を使用して遊離 TRITC の見積りをおこなった。図 2 では TRITC-albumin のピーク値を 100%として相対蛍光強度で表示した。その結果 TRITC-albumin 溶液の蛍光強度の内 10%は遊離 TRITC 由来であることがわかった。

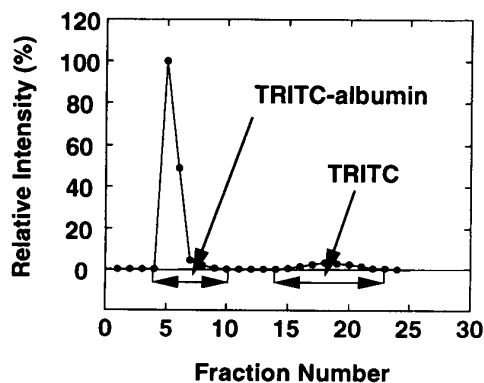
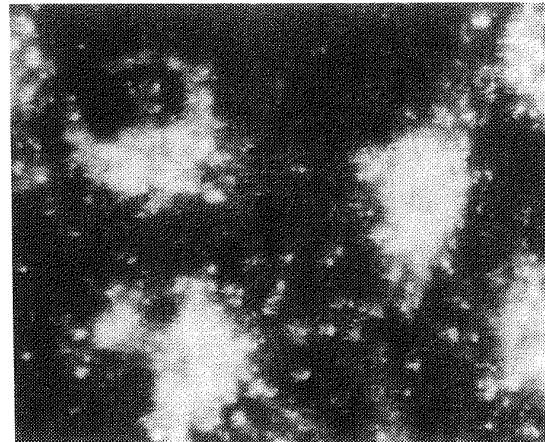


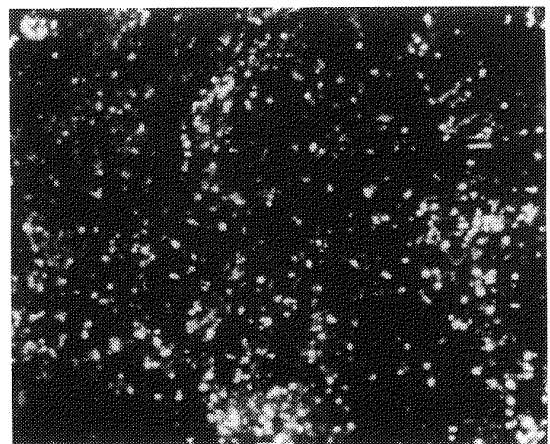
Fig. 2 Sephadex G50 chromatography TRITC-albumin and TRITC

この遊離 TRITC が画像からの取り込み量の見積りにどの様に影響するかを調べた。

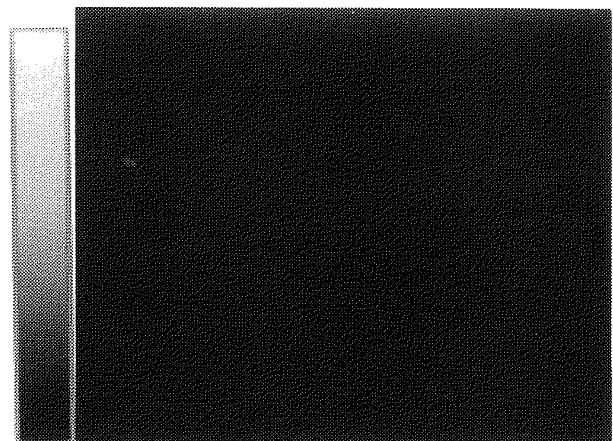
精製しない TRITC-albumin(遊離 TRITC を多く含む)中で 60 分間内皮細胞をインキュベートした時の



(a)



(b)



(c)

Fig. 3 Fluorescent images of (a) commercially available TRITC-albumin, (b) purified TRITC-albumin, and (c) free TRITC uptake into endothelial cells. bar=20 μm

結果を図3(a)に示す。また、3回フィルタを通過させて精製した溶液(溶液A)中での取り込みの結果を図3(b)に示す。また3回目のフィルタの濾液にアルブミンを加えた溶液(溶液B)を取り込ませたものを図

3(c)に示す。図3の像はすべて各断層の積算像で示した。

限界濾過フィルタを通過させなかった TRITC-albumin(遊離 TRITC を多く含む) [図3(a)] は、

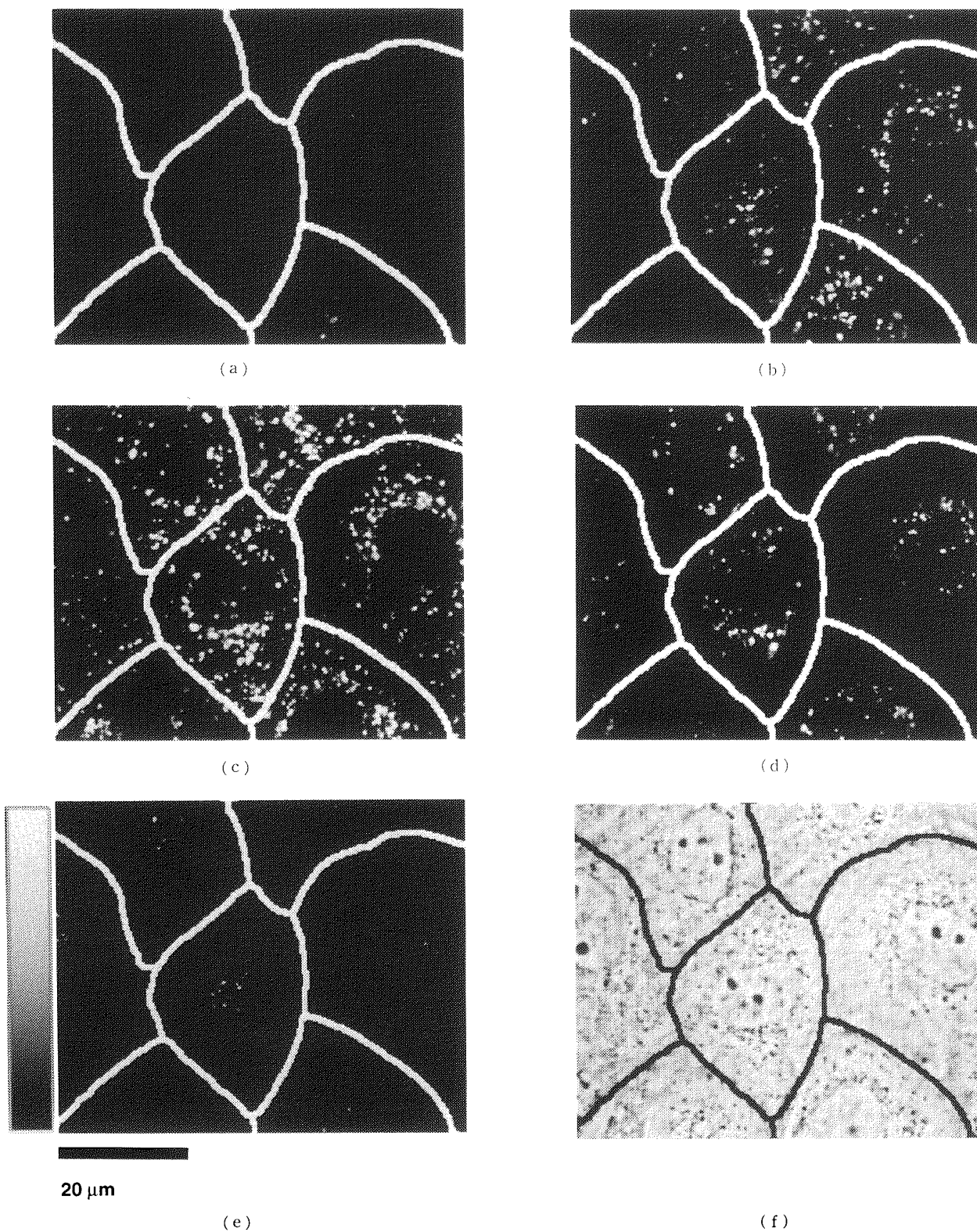


Fig. 4 3-dimensional images of TRITC-albumin uptake into endothelial cells. Series of optical sections of 1 μm depth of field through cells (a)-(e). (a) the bottom of cells, (b) 1 μm , (c) 2 μm , (d) 3 μm , (e) 4 μm from the bottom. The phase contrast image of endothelial cells (f). bar=20 μm

精製した TRITC-albumin [図 3 (b)] と比較して細胞内に多量に取り込まれているように観察でき、遊離 TRITC が多量に取り込まれていると考えられた。1, 2 回の精製では遊離 TRITC の影響を除くことはできなかったため 3 回精製をおこなった。図 3 (c) より溶液 A 中とはほぼ同濃度の遊離 TRITC は本実験の仮定では細胞内にほとんど取り込まれないことがわかった。4 回フィルタを通過させた TRITC-albumin の細胞内への取り込みは 3 回目の取り込み像、輝度ともに変化がないために 3 回のフィルタを通過させることで遊離 TRITC の影響を取り除くことができることがわかった。以上のことから、市販の蛍光標識された高分子の細胞内への取り込みを調べる際に遊離色素の影響を取り除かないと高分子の取り込みを多く見積もる可能性がある。

3・2 各断層におけるアルブミンの取り込み

図 4 に静置状態の細胞内へのアルブミン取り込みの深さ方向分布を示す。(a)-(e) は $1\ \mu\text{m}$ 間隔での光学的断層像を示す。また個々の細胞を識別するために輪郭を録取った。細胞の各断層で TRITC-albumin が細胞表面に付着している様子は観察されず、TRITC-albumin は細胞質内に取り込まれている。また、細胞間隙に TRITC-albumin は存在しなかった。また細胞の位相差像 (f) と比較すると TRITC-albumin は細胞内に取り込まれていた。せん断応力を負荷した細胞も同様に細胞内に取り込まれていた。

3・3 せん断応力の細胞内取り込みへの影響

48 時間せん断応力を負荷した細胞の位相差像と蛍光像を図 5 に示す。図 5 において蛍光像はすべて各断層の積算像で示した。位相差像から静置状態の細胞が多角形状をしているのに対してせん断応力を負荷した細胞は紡錘形の形状をとった。

$10\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ を負荷した細胞は流れを負荷していない細胞と比較してアルブミン取り込み部位が多く、また取り込み量も多いと考えられる。逆に、 $80\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ を負荷した細胞は流れを負荷していない細胞と比較して取り込み量が少ない。

次に細胞内での分布に関しては、流れを負荷していない細胞が核近傍に均等に取り込まれている(細胞 1) のに対して、せん断応力負荷した細胞では細胞内で細胞長軸方向に取り込み部位が偏り、かつ取り込み量も不均一であった(細胞 2)。

また、細胞層全体が一様な取り込みをおこなっているのではなく個々の細胞によりその取り込み量に差がみられた。特に、伸長した形状のものであっても取り込み量に差がみられ、これと形態との相関はなかった

(細胞 2, 細胞 3)。

せん断応力負荷に対するアルブミンの取り込みの関係を定量的に調べた(図 6)。 $1\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ を負荷した細胞では流れを負荷していない細胞に対して有意差がなくせん断応力の影響はないと考えられた。しかし、 $5\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ 及び $10\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ を負荷させた細胞では流れを負荷していない細胞に対して 1.2 倍, 1.3 倍に取り込みは増加したがそのばらつきが大きい。また $20, 40, 60, 80\ \text{dyn}/\text{cm}^2$ とせん断応力の増加に伴い、取り込み量は $0.74, 0.31, 0.24, 0.29$ 倍となり取込の抑制が観測され、このときのばらつきも小さくなった。

4. 検 討

4・1 内皮細胞層内へのアルブミン取り込み

高分子物質の細胞層内への取り込みは細胞内を通過するものと細胞間隙を通過するものに大別できる。ここで細胞内への取り込みの基本的な機構⁽¹²⁾ 及び最近の知見⁽¹³⁾ に触れておく。細胞内への取り込みは、まず細胞膜の一部が摂取しようとする物質を徐々に取り込み、次にそれが陥入して、しだいにくびれて膜から切り離され、摂取する物質を包んだ細胞内の小胞となる。この過程はエンドサイトーシスと呼ばれる。エンドサイトーシスは飲作用(ピノサイトーシス)と食作用(ファゴサイトーシス)に大別される。ファゴサイトーシスはマクロファージの様な特殊化した食細胞でおこなわれるため、一般にはピノサイトーシスとエンドサイトーシスは同義語として使用する。さらにエンドサイトーシスはクラスリンと呼ばれるタンパク質で被覆された被覆小胞とクラスリンで被覆されていない非被覆小胞(カヴェオレ)の 2 種類の小胞での輸送が確認されている。被覆小胞を介したエンドサイトーシスは、細胞表面にある特定のタンパク質である受容体(レセプター)に結合した高分子が被覆ピットと呼ばれる細胞の特定の領域に集められ、そこが陥入し被覆小胞を形成し受容体-高分子の複合体として特定の高分子を選択的に細胞内に取り込む。被覆ピットが陥入して小胞を形成する際には細胞外液とともに、そこに溶けていた物質も細胞内に取り込まれるが、その速度はきわめて遅い。この過程を液相エンドサイトーシスとよぶ。こうして、受容体を介したエンドサイトーシスは、高分子を特異的かつ最大限に取り込む。非被覆小胞(カヴェオレ)を介したエンドサイトーシスは、従来液相エンドサイトーシスのみと考えられてきたが、近年⁽¹³⁾ 受容体の存在が確認され非被覆小胞を介した取り込みも高分子物質の選択的取り込みを担っていることが分かってきた。

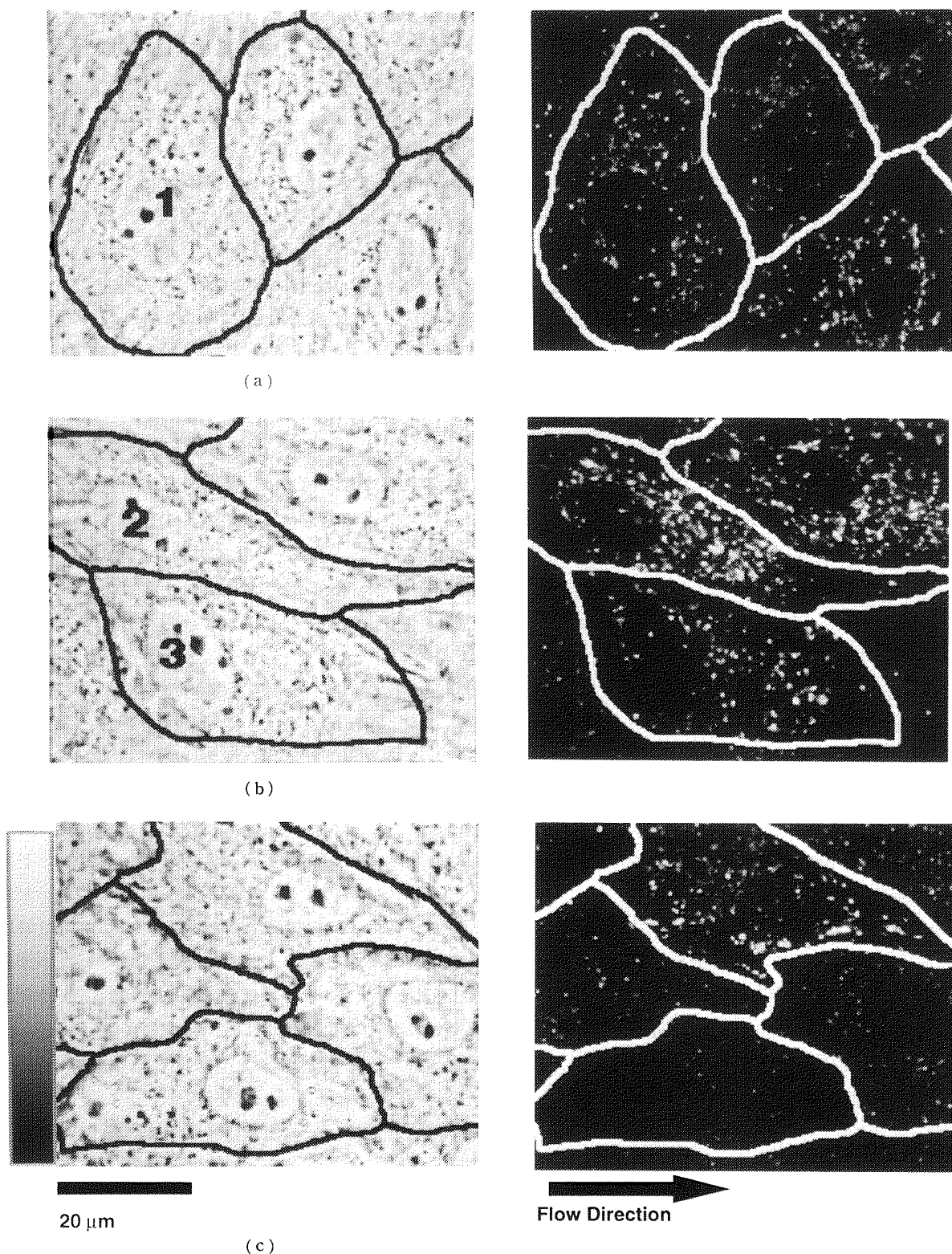


Fig. 5 Effect of shear stress on albumin uptake into endothelial cells. Phase contrast (left) and fluorescent (right) images of (a) control bells (no shear stress) (b) cells subjected to 10 dyn/cm² for 48 hour, and (c) cells subjected to 80 dyn/cm² for 48 hour. bar=20 μ

アルブミンの細胞内への取り込みはカヴェオラ上の受容体を介してエンドサイトーシスされることから⁽¹⁷⁾, 本研究においてもアルブミンが内皮細胞層に取り込まれる際には, 細胞間隙を通過するもの, または細胞内をカヴェオラ上の受容体を介して通過するもの

とに分けられる。しかし, 本研究ではアルブミンは細胞間隙には存在せず細胞内に多く存在した(図4, 図5)。Milicieら⁽¹⁸⁾はアルブミンの大部分を小胞内で確認し, 細胞間隙の入り口にはアルブミンの存在を確認したが間隙内での存在が確認できないと報告してい

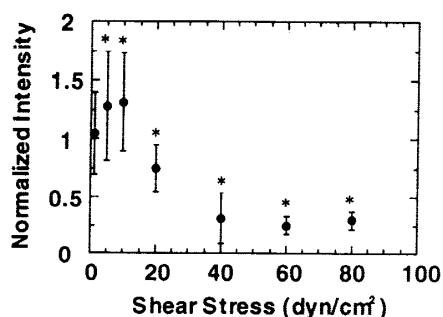


Fig. 6 Effect of different shear stress on albumin uptake into endothelial cells. Meas \pm S. D. (* $p < 0.05$ vs. no flow)

る。また、Ghiteshu ら⁽¹⁹⁾ は間隙端に集中しており間隙内での存在は僅かであると報告している。Schnitzer ら⁽¹⁷⁾ はアルブミンの培養内皮細胞層を介した透過を調べており、70%は細胞内を透過し30%は細胞間隙を透過すると報告している。以上のことから、本研究ではアルブミンの内皮細胞層内への取り込みはエンドサイトーシスで輸送されるものが主要であると考へた。

4.2 アルブミン取り込みに対するせん断応力の影響 Sprague ら⁽¹⁰⁾ は Low density lipoprotein (LDL) の取込に関して 1.30 dyn/cm^2 のせん断応力を24時間負荷させた取込について調べている。 1 dyn/cm^2 の負荷では LDL の取込はコントロール(no shear)に対して変化しなかったが、 30 dyn/cm^2 の負荷では LDL の取込は上昇し特にレセプターが関与した取込がせん断応力の影響を受けて上昇するという結果を得ている。また、Davies ら⁽⁹⁾ は horse radish peroxidase (HRP) に関して取込を調べ、変動するせん断応力を与えた場合にはピノサイトーシスによる輸送は継続的に上昇し、せん断応力変動が細胞の取り込み機能を変化させる重要な要素であると報告している。

これらの従来研究では、せん断応力の影響は高分子の取込が一過性に上昇するという結果であり、本研究の結果と異なる。 1 dyn/cm^2 のせん断応力負荷では Sprague らの結果と同様に本研究でもコントロールと比較して有意な取り込みの差が認められなかった。また細胞の変形伸張の程度が少ないことからせん断応力の影響をあまり受けていないためではないかと考えられる。しかし、 30 dyn/cm^2 のせん断応力負荷後の取込に関しては、Sprague らが取り込みの増大を報告しているのに対して本研究では減少している。この違いの原因として、取り込み物質の違い[LDL(分子量 2600 kDa, 等電点約 6), アルブミン(分子量 69 kDa,

等電点 4.9)]が挙げられる。LDL は被覆ピット内のレセプターを介して輸送されるのに対して、アルブミンはカヴェオレ内のレセプターを介して細胞内に取り込まれる事がこの差異の理由かもしれない。さらには血清などの実験条件の違いが反映されていることも考えられる。本研究においては培養時の血清の量は10%とし、せん断応力負荷時も培養条件と同じ組成の培養液を使用し、さらに、取り込みの際も培養時とほぼ同じ濃度であるアルブミン濃度 4 mg/ml を用いた。しかし、Sprague らは培養時には血清の量10%せん断応力負荷時には20%とし、LDLレセプターの発現を減少させている。これら上記の要因のために取り込みの機能を変化させるせん断応力値の違いがでたと考えられる。

本研究の結果は低せん断域で取り込みが最大1.3倍上昇し、高せん断域では取り込みが減少するという二相性を示した。特に、従来の研究と比べて異なる点は、高せん断域で細胞内への取り込みが減少するという点である。この結果の違いは、従来までの *in vitro* の研究が、 $0\text{--}30 \text{ dyn/cm}^2$ の範囲でしか調べられておらず、頸動脈分岐部モデルで見積もった最大値(109 dyn/cm^2)⁽⁴⁾ や大動脈弓モデルで見積もった最大値(136 dyn/cm^2)⁽²⁰⁾ と比較すると、限定されたせん断応力範囲のみでの計測であるために、その機能変化を十分に捉えていなかった可能性がある。

また、本研究においてその取込量に細胞間で差が生じていること(図5)に関しては、個々の細胞によりせん断応力の受け方が違うためではないかと考えられる。Yamaguchi ら⁽²¹⁾ は培養内皮細胞をモデル化し細胞周りの流れを数値解析により調べ、細胞の形状により細胞が受けるせん断応力の値が異なることを報告している。数値解析の結果から、細胞間での頂点のせん断応力の差は最大で約 10 dyn/cm^2 であること。また一つの細胞の下部と頂上のせん断応力の差は最大で約 15 dyn/cm^2 であることが報告されている。このことを考慮すると本研究においても個々の細胞が受けるせん断応力の値が細胞ごと、または細胞での局所部位で異なり、それが個々の細胞での異なった取り込みパターンを起こさせる原因となっていると考えられる。

アルブミンの取込がせん断応力の大きさに依存して変化するメカニズムは不明であるが、図4で示したように、アルブミンは細胞内を通過するものがほとんどであった。そのため、本研究でみられた変化は細胞内の輸送変化を捉えたものであり、細胞内の機能変化と密接に関連していると考えられる。高分子取込と細胞骨格⁽²²⁾ や、糖衣⁽²³⁾⁽²⁴⁾ との関連が報告されているよう

に、せん断応力の影響を受けた細胞が機能変化をおこし、それがアルブミンの取り込みの変化に影響を及ぼしていると考えられる。

本実験において細胞外マトリックスに関して考慮していない。細胞外マトリックスは細胞の外側に存在し、細胞構造の支持体として考えられていたが、近年大きくその役割が見直されてきている。物質透過に関しては、細胞外マトリックスの存在により透過性の上昇が報告されている⁽²⁵⁾。また、内皮細胞での細胞外マトリックスの合成が、せん断応力により促進されていることも報告されている⁽²⁶⁾。このことから生体内では内皮細胞と細胞外マトリックスとが強く相互作用をしていると考えられる。本研究では純粋に内皮細胞に対するせん断応力の影響を論ずるために細胞外マトリックスをコートしないカバーガラス上での物質取り込みに注目した。しかし、今後生体内の現象を把握していく上では細胞外マトリックス等を考慮したモデルを検討する必要がある。

4.3 アテローム性動脈硬化症発生との関連

アテローム性動脈硬化症は、平均せん断応力が低い部位で好発するということが、Caroをはじめ古くから報告されており、アテローム性動脈硬化症発生の機序の1つとして低せん断応力説が唱えられた⁽²⁷⁾。血管壁での物質生成や濃度境界層を含んだ壁近傍での物質輸送を考慮すると、低せん断領域で物質蓄積は進行する。しかし、本研究で得られた結果ではせん断応力の大小により内皮細胞の取り込み機能は大きく異なる(図6)。つまり、血液との界面である内皮細胞は単純な拡散壁として存在しているのではなく内皮細胞の物質取り込み機能がせん断応力によって変化し、それがアテローム性動脈硬化症の発生及び局在性に関与していると考えられる。

王ら⁽¹⁷⁾はウサギ大動脈弓分岐部における *in vivo* 実験において、スダン染色により脂質沈着部位を計測したところ、平均せん断応力が低い部位が染色され、また平均せん断応力が低い部位では HRP 標識の小胞数が多いと報告している。このことは、内皮細胞の物質取り込みとアテローム性動脈硬化症の初期にみられる血管壁での脂質沈着との間に何らかの関連性を示すものである。本研究の結果を考慮すると、内皮細胞はせん断応力の影響でその取り込み機能が変化する。このことがアテローム性動脈硬化症の最初期の段階である血管壁での物質沈着の局在性に大きく関与していると考えられる。

5. ま と め

本研究の結果から、アルブミンは内皮細胞層に取り込まれる際は細胞内を主要経路として輸送されることがわかった。また内皮細胞の取り込みはせん断応力の影響を受け、低せん断領域では亢進し、高せん断領域では抑制された。

文 献

- (1) Sawamura, T., ほか 10 名, *Nature*, **386** (1997), 73-77.
- (2) Schwenke, D. C. and Carew, T. E., *Arteriosclerosis*, **9** (1989), 895-907.
- (3) Caro, C. G., ほか 2 名, *Nature*, **223** (1969), 1159-11612.
- (4) Ku, D. N., ほか 3 名, *Arteriosclerosis*, **5** (1985), 293-302.
- (5) Yoshida, Y., ほか 5 名, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **598** (1990), 256-273.
- (6) Somer, J. B. and Schwartz, C. J., *Atherosclerosis*, **13** (1971), 293-304.
- (7) 王速・ほか 2 名, *動脈硬化*, **19** (1991), 1089-1100.
- (8) 安藤譲二, シェアストレスと内皮細胞, (1996), 9-143, メディカルレビュー社.
- (9) Davies, P. F., ほか 4 名, *J. Clin. Invest.*, **73** (1984), 1121-1129.
- (10) Sprague, E. A., ほか 3 名, *Circulation*, **76** (1987), 648-656.
- (11) Jo, H., ほか 3 名, *Am. J. Physiol.*, **260** (1991), H 1992 H 1996.
- (12) Shasby, M. D. and Shasby, S. S., *J. Appl. Physiol.*, **60** (1986), 71-7910.
- (13) Voyta, J. C., ほか 3 名, *J. Cell. Biol.*, **99** (1984), 2034-2040.
- (14) Richik, G. N., ほか 2 名, *J. Cell. Sci.*, **107** (1994), 2177-2189.
- (15) Alberts, B., ほか 5 名, 細胞の分子生物学第 2 版, (1991), 326-330, 教育社.
- (16) Schnitzer, E. J., *Cardiovasc. Med.*, **3** (1993), 124-130.
- (17) Schnitzer, E. J. and Oh, P., *J. Biol. Chem.*, **269** (1994), 6072-6082.
- (18) Milici, J. A., ほか 3 名, *J. Cell. Biol.*, **105** (1987), 2603-2612.
- (19) Ghitescu, L. and Bendayan, M., *J. Cell. Biol.*, **117** (1992), 745-755.
- (20) 駒井豊・ほか 3 名, *機論*, **59**-560.B (1993), 1079-1086.
- (21) Yamaguchi, T., ほか 6 名, *Bioengineering Conference ASME*, **24** (1993), 167-170.
- (22) Liu, S. M., ほか 2 名, *J. Cell. Physiol.*, **156** (1993), 311-316.
- (23) Arisaka, T., ほか 5 名, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **748** (1995), 543-554.
- (24) Seno, S., ほか 2 名, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **416** (1983), 410-425.
- (25) Ohshima, N. and Okawa, K., *Cell Mechanics and Cellular Engineering* (1994), 107-117, Springer-Verlag.
- (26) Thoumine, O., ほか 2 名, *Lab. Invest.*, **73** (1995), 565-576.
- (27) Caro, C. G., ほか 2 名, *Proc. Roy. Soc. Lond. B*, **177** (1971), 109-159.