

令和3年度 修士論文

毛細血管様構造を持つ
再生医療用エラスチン足場の開発

三重大学大学院 工学研究科 博士前期課程

分子素材工学専攻

倉田園加

目次

1. 緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

1-1 再生医療における組織工学と現在の課題

1-2 血管

1-2-1 毛細血管

1-2-2 血管形成

1-3 血管内皮細胞 (Vascular Endothelial Cells)

1-4 細胞外基質

1-4-1 コラーゲン

1-4-2 エラスチン

1-5 先行研究

1-5-1 エラスチン AE 混合ゲルの構造について

1-5-2 血管内皮細胞のエラスチン添加培養について

1-5-2-1 エラスチン添加培養の概要と用いた血管内皮細胞の単離・同定

1-5-2-2 Real Time PCR 法による遺伝子発現評価

1-5-2-3 血管内皮細胞の3次元培養

1-6 本研究の目的

2. 実験・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・13

2-1 細胞外基質の抽出

2-1-1 水溶性エラスチンの抽出

2-1-2 水溶性エラスチンの分画

2-1-3 水溶性コラーゲンの抽出

2-2 エラスチンゲルシートの作製

2-3 エラスチンゲルシート内流路の作製と各種評価

2-3-1 ナイロン糸・PVA 糸を用いた流路作製

2-3-2 浸潤速度調査

2-3-3 糸の融合

2-3-4 分岐作製

2-4 流速測定

2-4-1 直線・分岐時の流速測定

2-4-2 歪み条件下の流速測定

2-4-3 歪み条件下の圧力測定

2-5 統計処理

3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・21

3-1 エラスチンゲルシートの評価

3-1-1 各組成のエラスチンゲルの構造評価

3-1-2 各エラスチンシートでの浸潤速度

3-1-3 浸潤速度のまとめ

3-2 流路の複雑化検討

3-2-1 蒸気による融合

3-2-2 光架橋剤による融合

3-2-3 光架橋剤による融合糸のゲル内留置

3-3 流速測定

3-3-1 直線・分岐時の流速

3-3-2 歪み条件下の流速

3-3-3 歪み条件下の圧力測定

4. 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38

4-1 各条件のエラスチンゲルシートでの浸潤速度に関して

4-2	架橋糸の直径について(理論値との比較)	
4-3	流速の妥当性	
4-4	歪み条件下の圧力について	
4-5	エラスチンゲルシートと細胞に関する推定	
5.	結論	50
6.	謝辞	51
7.	参考文献	52

1. 緒言

1-1 再生医療における組織工学と現在の課題

再生医療とは、病気やけがで失われた臓器や組織を再生して元に戻す医療のことであり、これを支える技術として「組織工学」が知られている¹⁾。

組織工学において重要な3つの要素を以下に示す²⁾。

- ①適切なはたらきをする細胞
- ②細胞を支持するための適切な環境(足場)
- ③細胞の生理活性に関与する成長因子などの分子

他に、細胞の成長に影響を与える物理的・機械的刺激も重要とされる。

ただ、組織工学によって作製された臓器や組織における課題として、酸素の浸透不足による壊死が挙げられる。拡散による酸素の浸透は、最も近い血管から約 150～200 μm の距離に限られており、大きく複雑な 3 次元構造の組織の長期的な生存のためには、新たな血管の急速な発達が必要となる³⁾。

1-2 血管

1-2-1 毛細血管

一般的な血液の流れは、まず、心臓の左心室から強力な収縮によって大動脈に送り出され、頭や腕、上半身、下半身へと大動脈は分岐し、小動脈、細動脈とさらに分岐を重ね、毛細血管領域において、筋肉や皮膚、臓器などに酸素と栄養素を供給し、二酸化炭素と老廃物を回収する。この血液は静脈血といい、毛細血管から後毛細血管細静脈、小静脈、大静脈と運ばれ心臓の右心房に入る(Fig. 1-1)。この一連の血液循環は体循環(大循環)と呼ばれる⁴⁾。

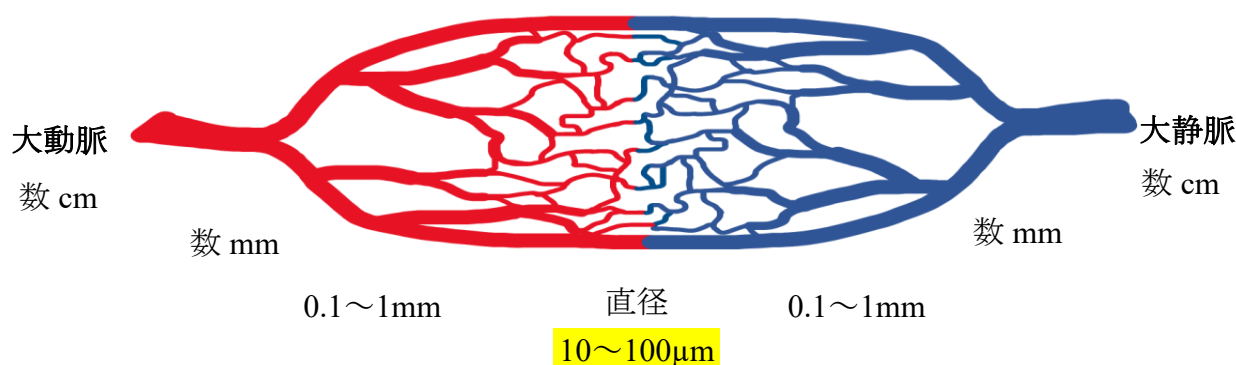


Fig. 1-1 血液の循環と血管径

この内、直径が 10～100 μm の微小血管(毛細血管とその前後にある細動脈・細静脈で構成される血管系)の領域を微小循環といい、血液循環により血液と各組織細胞と

の間の物質交換や体液循環の調節を担うため、生体恒常性に重要な血管系である⁵⁾。

微小循環の模倣のために、二十年ほど前から「マイクロ流路を用いた細胞培養系」に関する報告がされている。マイクロ流路とは、半導体微細加工技術や近年では 3D プリンターなどによって作製された、幅・深さが数 μm ～数百 μm の流路構造である。特に、血管に関連した報告としては、生体の血流を模倣しながら細胞を培養することで、生体組織の環境や条件を再現することができるというものがある。さらにこれらの血管は、生体組織工学におけるパーツとしての役割も期待されている⁶⁾。

流路の材質としては、PDMS (ポリジメチルシロキサン) が多用されている。利点としては、微細構造を簡便に、再現性良く作製できること、透明性が高く内部観察が容易であることや細胞に対する毒性が低いことなどが挙げられる。そのため、細胞挙動の観察や薬物スクリーニングといった用途のために活発に研究が行われている。

しかし、一方で、生体適合性は短期間に限られており、生体内留置のように長期的に使用した場合は血栓形成や補体活性などが引き起こされるため、長期の使用を前提とした埋め込み型人工臓器への応用は難しいとされる⁷⁾。

毛細血管は、一層の血管内皮細胞とその周囲を基底膜が取り囲んだ構造をしており、散在する周皮細胞もみられる。基底膜は、IV型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカンなどのタンパク質で構成されている。直径は最も細いところで約 10 μm で、その総延長はヒトで 10 万kmに及ぶとされており、毛細血管壁を通して、血液中の酸素や栄養分と組織中の老廃物を交換している。

また、毛細血管は血管内皮細胞の構造によって、以下のように連続型・有窓型・類洞型の 3 種類に分類される (Fig. 1-2)。

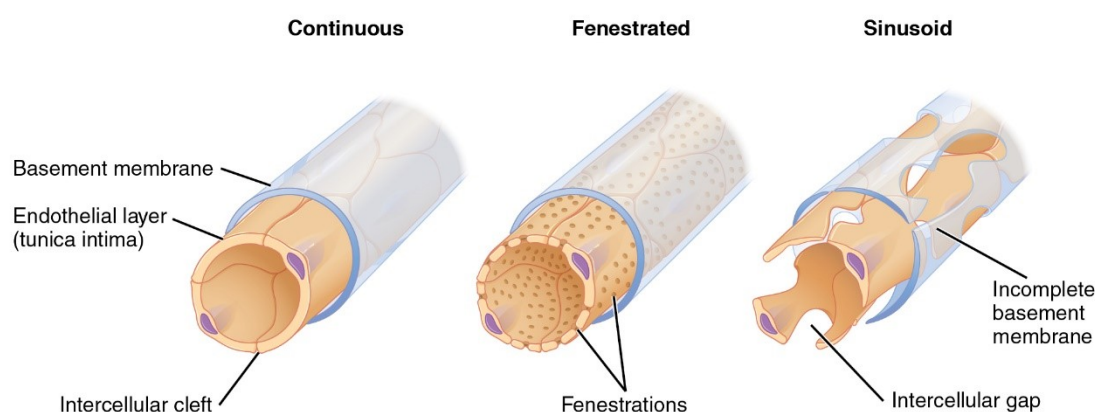


Fig. 1-2 毛細血管の種類 (左から、連続、有窓、類洞)⁸⁾

連続型毛細血管は、最も一般的であり、生体内全体に存在する。連続した切れ目のない血管内皮細胞によって覆われ、基底膜も連続している。小分子は、細胞膜、細胞質を通して拡散し、10kDa 以下の親水性分子は接合部を通過して拡散する。有窓型

毛細血管は、血管内皮細胞に小孔があり、連続型より物質透過性に有利な構造で、基底膜は連続している。特に、腎糸球体、内分泌腺、小腸絨毛などにみられる。類洞型毛細血管は、血管内皮細胞も基底膜も不連続であり、高分子のみならず、血液中の血球成分も血管腔内外を移動可能である。特に、肝臓でみられる^{9, 10)}。

1-2-2 血管形成

血管形成は、おもに胎児期に観察され、無血管領域における内皮細胞の発生、管腔形成に始まる「脈管形成」と、その後、胎児期、出生後にかかわらず、既存の血管から新たな血管が伸長あるいは分断する「血管新生」という2つのプロセスに大別できる (Fig. 1-3)。

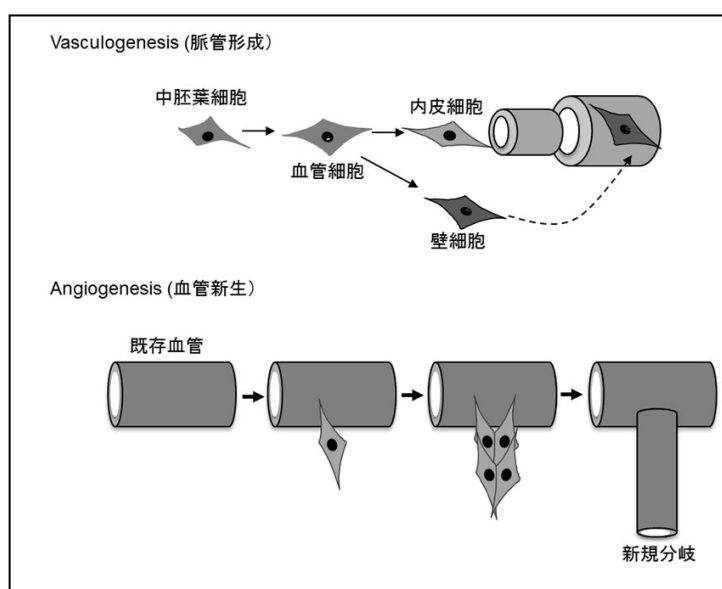


Fig. 1-3 血管新生と脈管形成のプロセス¹¹⁾

中胚葉からの内皮細胞の発生には、血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) -A とその受容体の中でも VEGFR-2 (Flk1) が最も重要である。さらに、その後の内皮細胞の増殖やマトリックス消化、移動、管腔形成にも関連する。また、管腔を形成した内皮細胞が周皮細胞 (壁細胞) を動員するときは、主に、内皮細胞から分泌される血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor: PDGF) -BB が周皮細胞に発現するその受容体 PDGFR β を活性化する。内皮細胞に寄ってきた周皮細胞は、アンジオポエチン (angiopoietin: Ang) -1 を分泌し、内皮細胞に発現する Tie-2 受容体に結合して活性化し、内皮細胞と周皮細胞の直接的あるいは細胞外マトリックスを介した接着を誘導し、構造が安定する⁹⁾。

血管新生が生じている際に、Tie2 の活性化シグナルが大きく入った内皮細胞では、apelin の分泌が増加する。Apelin は 77 個のアミノ酸として細胞外に放出され、最終的に酵素修飾を受けた C 末端の 13 個のアミノ酸残基 (apelin13) が血管内皮細胞に発現するその受容体 (APJ; 7 回膜貫通型の G タンパク質共役受容体) を活性化し、内皮

細胞同士の細胞集塊を大きくさせて、毛細血管レベルでの血管径を太くさせる¹²⁾。

1-3 血管内皮細胞 (Vascular Endothelial Cells)

血管内皮細胞は血管内腔を覆う一層の扁平な細胞である。大血管では、内弾性板を介して平滑筋細胞と接しているが、毛細血管では平滑筋細胞を欠き、周皮細胞を伴っている (Fig. 1-4)。

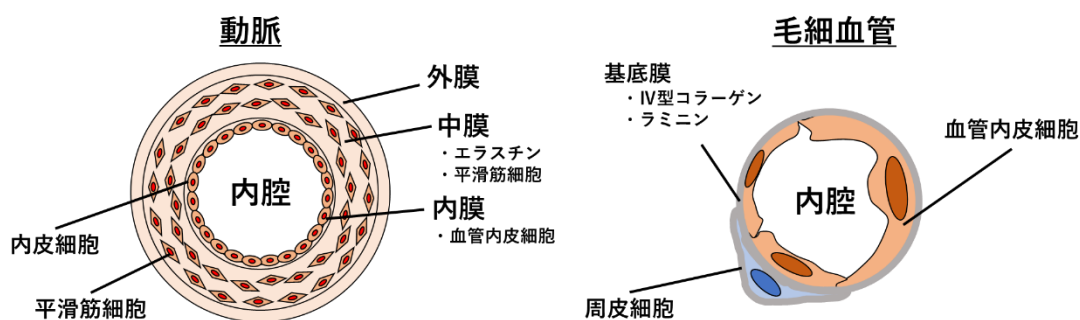


Fig. 1-4 動脈と毛細血管の断面図

血管内皮細胞が持つ機能としては、血管の透過性、凝固能、血管壁の収縮に関与する物質の調節、炎症の制御、再生などがあり、これらは、物理的刺激や生理活性物質により制御されている。また、形態や機能は、臓器によって異なることが知られている¹³⁾。

また、特異的マーカーとして、PECAM-1 (platelet endothelial cellular adhesion molecule-1)や VE-カドヘリンなどが知られている。PECAM-1 は、イムノグロブリンスーパーファミリーに属する 130kDa の I 型膜糖タンパク質であり、細胞間接着分子として機能する。

さらに、血管内皮細胞の2次元培養と3次元培養では、全く異なる形態を示すことが大きな特徴として知られている (Fig. 1-5)。

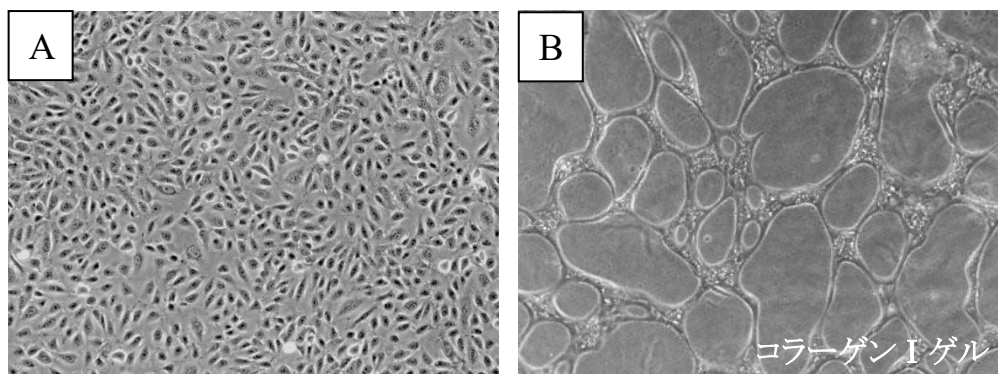


Fig. 1-5 血管内皮細胞の2次元培養と3次元培養¹⁴⁾

(A) 2次元培養 (B) 3次元培養

1-4 細胞外基質

1-4-1 コラーゲン

コラーゲンは、分子量約 30 万 kDa の生体内にもっとも豊富に存在するタンパク質であり、その高い生体親和性から組織工学において、主に細胞の足場材料として利用されている。 $(\text{Gly-X-Y})_n$ の繰り返しからなる 3 本鎖ヘリックス構造であり、現在、コラーゲンは 29 種類あるとされており、I 型、II 型…という型で分類されている¹⁵⁾。コラーゲン分子の両端にはヘリックス構造を持たないテロペプチドがあり、この部分は抗原性を示すため、材料として使用する際は、ペプシン処理によってテロペプチドを除去した抗原性の低いアテロコラーゲンが利用される (Fig. 1-6)。

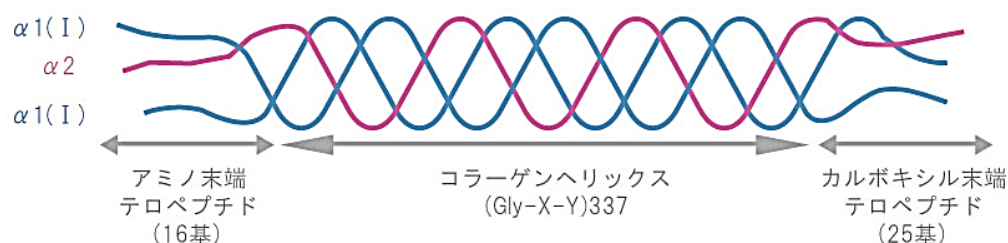


Fig. 1-6 I 型コラーゲンの構造¹⁶⁾

I 型コラーゲン

多細胞生物の細胞外マトリックスの主成分となっている線維性コラーゲンであり、 $\alpha 1(I)$ 鎖と $\alpha 2(I)$ 鎖が 2:1 の比で構成されるヘテロな 3 量体分子である。すべての臓器に存在するが、特に、骨や腱、真皮、靱帯に豊富である¹⁷⁾。

IV 型コラーゲン

基底膜の主要成分である。線維状の I 型コラーゲンとは異なり、網目状の会合体を形成する。 $\alpha 1$ から $\alpha 6$ までの 6 種類の α 鎖が 3 種類以上の組み合わせの分子種をつくる¹⁷⁾。コラーゲン分子の 7S ドメインは相互作用して四量体を形成し、NC1 ドメインは相互作用して二量体を形成する。三重らせんドメインに沿った横方向の会合により、IV 型コラーゲンネットワークの分岐とさらなる強化が可能になる (Fig. 1-7)¹⁸⁾。血管において、血管内皮細胞直下の基底膜や中膜の平滑筋細胞周囲の基底膜は、 $\alpha 1(IV)$ 鎖と $\alpha 2(IV)$ 鎖が 2:1 でつくられた分子が多く存在し、特に毛細血管の基底膜はこの分子が主成分である¹³⁾。

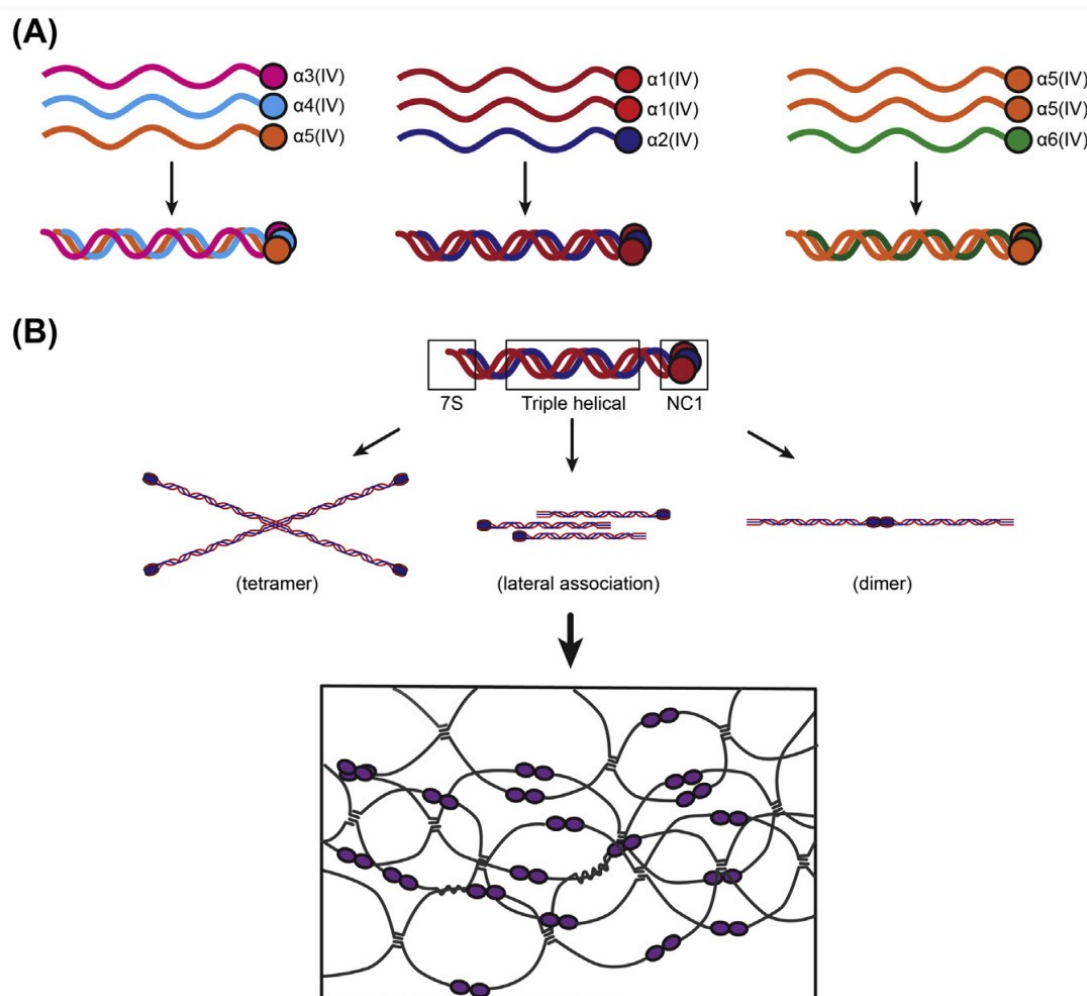


Fig.1-7 IV型コラーゲンの構造¹⁸⁾

コラーゲンは、細胞の分化や増殖、細胞の形や移動を制御するなど恒常性維持にきわめて重要な機能を果たしている。

1-4-2 エラスチン

エラスチンは分子量約 67kDa の線維状タンパク質で、細胞外マトリックスの一つである。フィブリリンなどのタンパク質とともに、弾性・伸縮性に富んだ弾性線維を形成している。その特徴から、伸縮性・弾性を必要とする靱帯、血管(特に動脈)、肺などに多く存在している。

エラスチンは、前駆体であるトロポエラスチンが凝集し、側鎖のリシンがリシルオキシダーゼの作用によってデスモシン架橋を構築することで成熟していくといわれている。この架橋構造は Fig.1-8 が示すようなリシン 4 残基によって構成されるエラスチン特有のものであり、これによってエラスチンは弾性・伸縮性といった性質を発揮している。また、非極性アミノ酸の含有が高く、特徴的なアミノ酸配列として、VGVPAG (Val-Gly-Val-Ala-Pro-Gly) を有している。

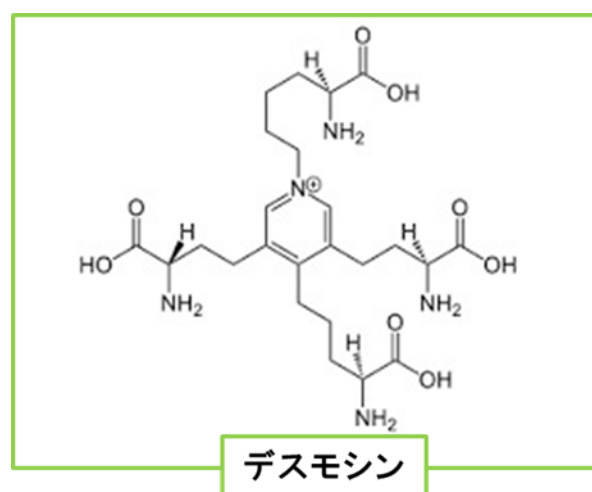
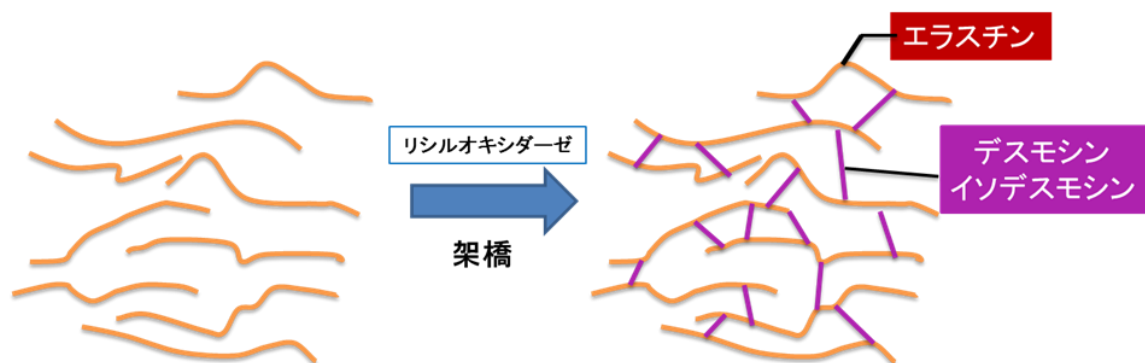


Fig.1-8 デスモシン架橋の形成と構造 ¹⁹⁾

1-5 先行研究

1-5-1 エラスチン AE 混合ゲルの構造について

H29 年度井上修士論文より、エラスチン A とエラスチン E を混合させたエラスチン AE ゲルにおいて、貫通孔が確認された (Fig. 1-9)²⁰⁾。これは、ゲル化するエラスチン A とゲル化しないエラスチン E の混合により相分離が生じ、AE 混合ゲル作製後、脱イオン水中での洗浄中に、エラスチン E 部位が流出することによる生じた連続孔であると考えられている。

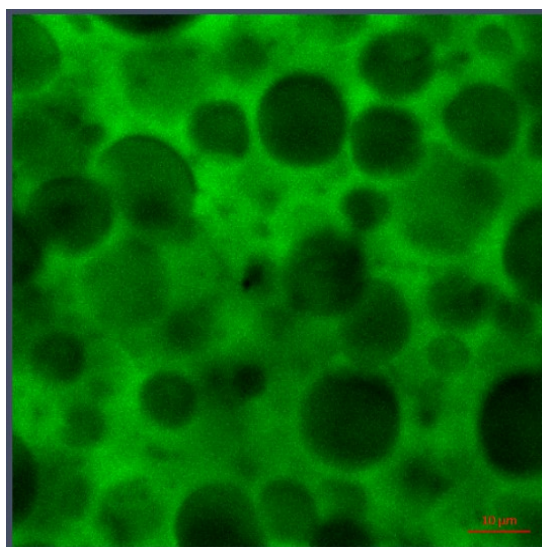


Fig. 1-9 ElastinA:ElastinE=50:50 のエラスチンゲルの共焦点レーザー顕微鏡画像²⁰⁾

1-5-2 血管内皮細胞のエラスチン添加培養について

別の先行研究より、以下の結果が示された。

【概要】

エラスチン A を培地に添加すると、血管内皮細胞がエラスチン A の刺激を受けて、通常培養と比べて、毛細血管の周囲に存在する細胞外マトリックスの遺伝子発現や毛細血管様構造の割合に差が生まれることがわかった²¹⁾。

1-5-2-1, 2, 3 に詳細内容を示した。

1-5-2-1 エラスチン添加培養の概要と用いた血管内皮細胞の単離・同定

【細胞の単離・同定】

血管内皮細胞は、(株)四日市畜産公社から頂いたブタ大動脈内膜の酵素(ディスパーゼ II)処理によって単離した。単離した細胞の同定のために、ポジティブマーカーとして内皮細胞の細胞膜上に存在するタンパク質である PECAM-1 (platelet

endothelial cell adhesion molecule) の免疫蛍光染色を行った。

Table 1-1 血管内皮細胞の同定に用いた抗体（ポジティブマーカー）

	抗体名	希釈倍率
1次抗体	Anti CD31/PECAM-1 rabbit polyclonal Antibody (Novusbio)	1:100
2次抗体	Goat anti-rabbit IgG (H+L), FITC conjugate (proteintech)	1:200

Table 1-2 血管内皮細胞の同定に用いた抗体（ネガティブマーカー）

	抗体名	希釈倍率
1次抗体	Anti-alpha smooth muscle Actin mouse monoclonal antibody (Novusbio)	1:200
2次抗体	Goat anti-mouse IgG (H+L), FITC conjugate (Merck Millipore)	1:200

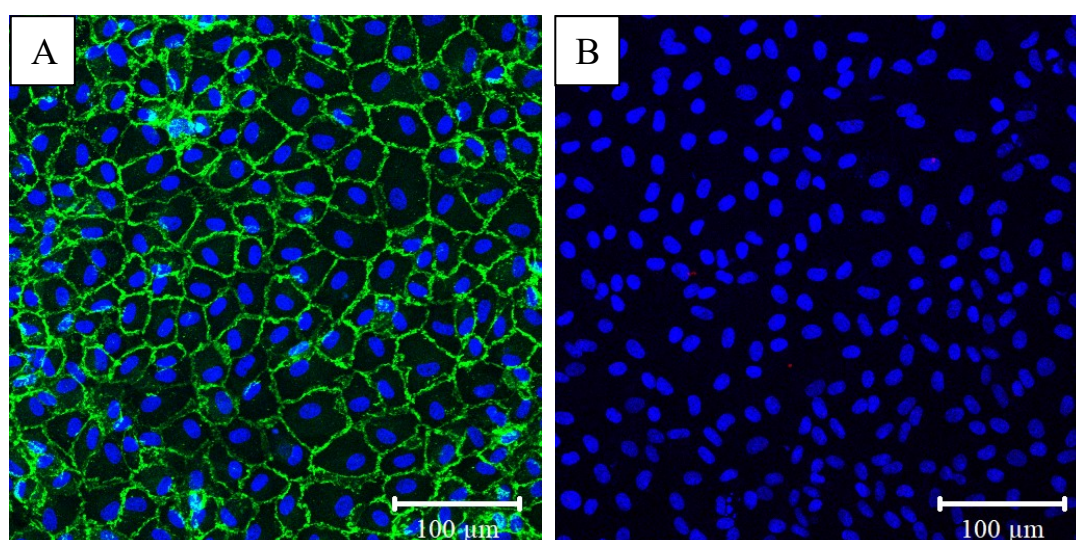


Fig. 1-10 (A) PECAM-1 の免疫蛍光染色 (B) α -SMA の免疫蛍光染色
(青:細胞核、緑:PECAM-1、赤: α -SMA)

染色結果より、血管内皮細胞に特異的なマーカーである PECAM-1 の蛍光が細胞膜上に確認でき、ネガティブマーカーである α -SMA の蛍光は確認されなかった。よって、ブタ大動脈内膜から単離した細胞は、血管内皮細胞と同定した (Fig. 1-10)。

1-5-2-2 Real Time PCR 法による遺伝子発現評価

Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (Real-Time RT PCR)法を用いて、通常培地 (10%FBS/DMEM)、エラスチン A 添加培地 (10%FBS/DMEM にエラスチン A が 0.5mg/mL となるように添加) で培養した血管内皮細胞の遺伝子発現を評価した。

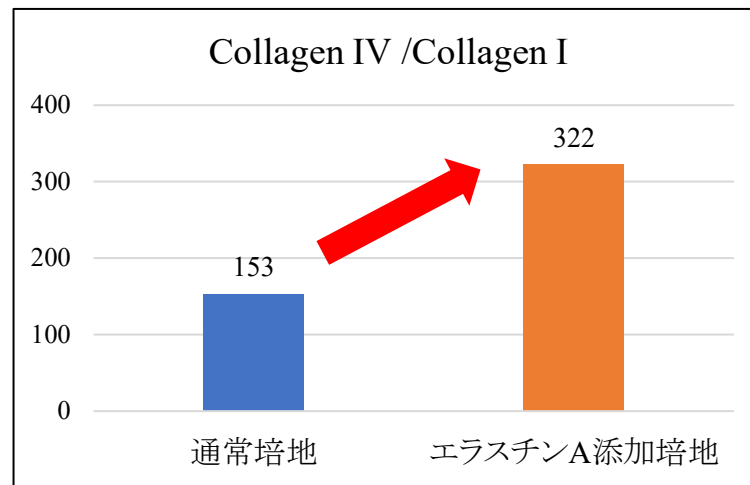


Fig. 1-11 Collagen I に対する Collagen IV の割合

Collagen I に対する Collagen IV の発現比率の増加がみられた (Fig. 1-11)。

Collagen IV は、毛細血管を構成する基底膜の成分であることから、エラスチンの添加が毛細血管網にとってよりよい環境を提供する可能性が示唆された。

1-5-2-3 血管内皮細胞の3次元培養

同定後、血管内皮細胞をコラーゲンゲル内で培養を行った。その際、通常培地、エラスチン A 添加培地の2種類のサンプルを用意した。以下の抗体を用いて、血管内皮細胞の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 (Carl Zeiss, LSM710) を用いて蛍光観察を行った。

Table 1-3 コラーゲンゲル内の内皮細胞の観察に用いた抗体

	抗体名	希釈倍率
1次抗体	Anti CD31/PECAM-1 rabbit polyclonal Antibody (Novusbio)	1:100
2次抗体	Goat anti-rabbit IgG (H+L), FITC conjugate (proteintech)	1:200

コラーゲンゲル内の血管内皮細胞の評価のために、免疫蛍光染色の画像から、毛細血管様構造の面積を算出した。

算出方法は、白線の長さ×赤線の長さの積を求め、それを毛細血管様構造の面積とした (Fig. 1-12)。その面積を PECAM-1 の全体の蛍光面積で割ることによって、毛細血管様構造の割合を算出し、比較した。PECAM-1 の全体の蛍光面積は、ImageJ を用いて測定した。

$$\frac{\text{毛細血管様構造の面積}}{\text{PECAM-1 全体の面積}} \times 100 (\%)$$

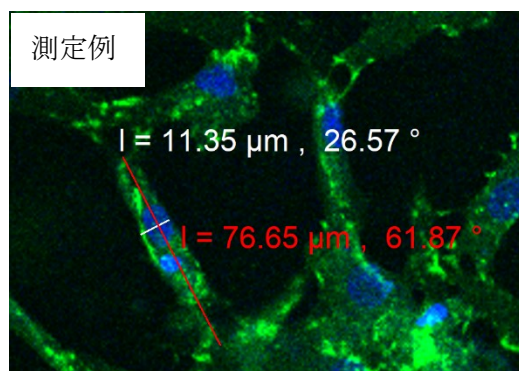


Fig. 1-12 毛細血管様構造の面積測定例

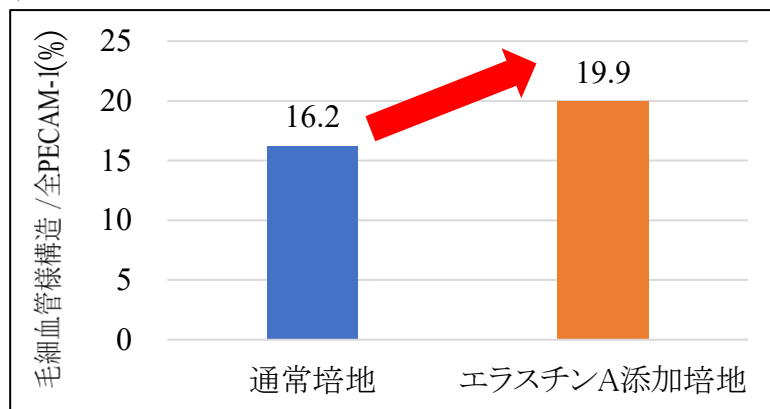


Fig. 1-13 通常培地とエラスチン A 添加培地の毛細血管様構造割合の比較

結果として、エラスチン A を培地に添加すると、毛細血管様構造が増加するという傾向が見られた (Fig. 1-13)。

1-6 本研究の目的

細胞を用いて厚い組織工学的人工臓器を作製する際、機能や構造を保つには、全ての細胞に酸素や栄養を行き渡らせるための毛細血管が必要である。具体例としては、人工肺・人工皮膚・人工腎臓などの作製での毛細血管の必要性が考えられる。これらは、将来的には、3次的に大きな構造となることが予想され、さらには、伸び縮みや圧縮などの動きが重要となってくる臓器である。このことから、伸縮性に富んだエラスチンという材料が有望であると考えた。

また、血管内皮細胞は、Dish で培養すると敷石状の構造をとるが、コラーゲンゲル内で培養すると、血管様構造の形成が行われることが知られている²²⁾。これは、先行研究により確認し、さらに、エラスチンの添加が毛細血管網構築により良い環境を提供することが示唆された。

さらに、エラスチン AE 混合ゲルにおいて、貫通孔が確認されており、物質交換が重要である毛細血管シートの基板として、エラスチンを用いることの有用性が期待される。

これらより、本研究では、生体適合性・伸縮性のある細胞外基質のエラスチンを用いて、微小流路を持つ細孔ゲルシートを作製すること、そして、物質浸潤や分岐時の流速の観点から評価することを目的とし、毛細血管様構造を持つ足場の開発を目指した。

2. 実験方法

2-1 細胞外基質の抽出

2-1-1 水溶性エラスチンの抽出

(株)四日市畜産公社から頂いたブタ大動脈から精製した不溶性弾性線維に 0.25M シュウ酸水溶液を加え、熱することにより水溶化処理を行った。得られた上澄み液を透析用セルロースチューブに入れ、外液の浸透圧が 0 mOsm、pH が 4.5 以上になるまで透析を行った。透析した液を遠心分離し、得られた上澄みをセルロース膜フィルターで吸引ろ過した後、凍結乾燥し、水溶性エラスチンを得た。

2-1-2 水溶性エラスチンの分画

2-1-2 で抽出した水溶性エラスチンを以下の条件で分画した。

Table 2-1 エラスチンの分画

エラスチンのクラス	A	B	C	D	E
弾性率 (kPa)	50~	25~50	5~25	~5	ゲル化不可
凝集温度 (°C)	20~22.5	22.5~25	25~30	30~35	35~

測定方法を次に示した。

【弾性率】

エラスチン濃度 40%、架橋倍率 2 倍となるように、水溶性エラスチン、Dode-DSP、Milli-Q をアシストチューブ内で混合した。完全溶解させたエラスチン溶液を内径 1mm のキャピラリーに詰め、栓をした後に、ねじ口試験管に入れて遠心した。遠心後、その試験管を脱イオン水で満たし、恒温槽で 70°C、30 分加熱した。その後、試験管をアルミホイルで包み、オートクレーブで 121°C、30 分加熱しゲル化させた。ゲル化後、キャピラリーからゲルを取り出し、脱イオン水に浸し、インキュベーターで 37°C、一晩静置した。翌日、弾性率の測定を行った。

【凝集温度】

エラスチン濃度 1% (w/w) となるように、水溶性エラスチン、Milli-Q をサンプルチューブ内で調整した。溶液を試料セルに移しかえて透過光測定装置にセットした。恒温槽で溶液の温度を少しずつ上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

2-1-3 水溶性コラーゲンの抽出

(株)四日市畜産公社から頂いたブタ大動脈から外膜以外の部分を除去した。5% クエン酸溶液に 1 mg / mL となるようにペプシン (Wako) を添加した酵素溶液を作製し、外膜を入れて 2 週間溶解させた。酵素溶液にて溶解した部分をろ過し、ジエチルエーテル (Wako) 処理を行った。エーテル層を遠心分離で除去し、2.4M NaCl (関東化学株式会社) を加え遠心、さらに、1.7M NaCl を加え遠心し、生じた沈殿を透析チューブに入れ、外液の塩濃度が 0 になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を凍結乾燥させてコラーゲンを得た。

抽出したコラーゲンを 1 mM の HCl 溶液に溶解し、0.22 μ m フィルターで滅菌ろ過した。凍結乾燥を行った後、滅菌コラーゲンとして使用した。

ここで得られたコラーゲンは、I 型コラーゲンと III 型コラーゲンの混合物である。本論文ではコラーゲンと表記した。

2-2 エラスチンゲルシートの作製

ガラス板の上にシリコンシート枠(厚さ 0.2mm×2 枚)を置き、そこへエラスチンプレゲル溶液を入れ、ガラス板ではさんだ。エラスチンプレゲル溶液は、水溶性エラスチン、Dode-DSP、Milli-Q を混合後、加速剤として炭酸ナトリウムを加えたものを示す。

エラスチン A ゲルシートは、エラスチン A:エラスチン E=100:0、エラスチン AE ゲルシートは、エラスチン A:エラスチン E=50:50 の割合で混合させたものである。

上下をクリップで固定し、遠沈管にいれ、1500rpm で 5 分間遠心した。遠沈管内を脱イオン水で満たし、37°C でインキュベートした。翌日ガラスを慎重に外し、ゲルを脱イオン水中静置した (Fig. 2-1)。

ゲルシートの大きさは、縦 15mm、横 10mm、厚さ 0.4mm で作製した。

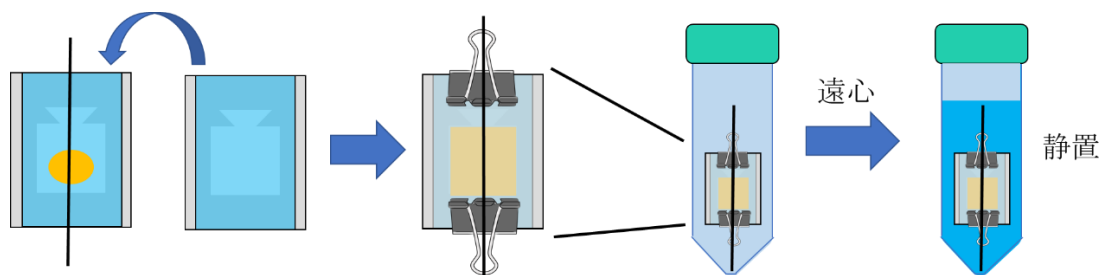


Fig. 2-1 エラスチンゲルシートの作成手順

2-3 エラスチンゲルシート内流路の作製と各種評価

2-3-1 ナイロン糸・PVA 糸を用いた流路作製

【浸潤速度調査用:ナイロン糸…ファイター溪流(山豊テグス株式会社)】

流路作製のために、2-2 の流路作製過程のプレゲル溶液流入後に、直径 100 μm ナイロン糸を置き、ガラス板ではさんだ。2-2 の過程終了後、慎重に糸を引き抜いた。

【分岐作製用:PVA 糸…水溶性繊維ソルブロン(株式会社ニチビ)】

流路作製のために、2-2 の流路作製過程のプレゲル溶液流入後に、PVA 糸を置き、ガラス板ではさんだ。2-2 の過程終了後、PVA 糸を溶かし出すために、97℃以上の熱湯に 15 分～30 分浸漬した(Fig. 2-2,3)。流路の穴の直径は、ImageJ を用いて穴の面積を測定し、穴を円と仮定して算出した。

ナイロン糸の直径は、0.104mm(約 100 μm)である。

PVA 糸の物性表は以下の通りである(Fig. 2-2)。

タイプ	溶解処理温度	繊度 (T:dtex / F:filament)	乾強度 (cN/dtex)	乾伸度 (%)	溶解点 (°C)	水中収縮率(%)		水中収縮力 (cN/dtex)
						最大(水温)	25°C時	25°C時
SH	95°C以上	31T/9F 62T/18F	3.3～4.3	11～18	89～97	35～55 (85°C)	0～5	0.04～0.15

Fig. 2-2 用いた PVA 糸の物性¹⁹⁾

また、PVA 糸は以下の過程を経て溶解する(Fig. 2-3)。

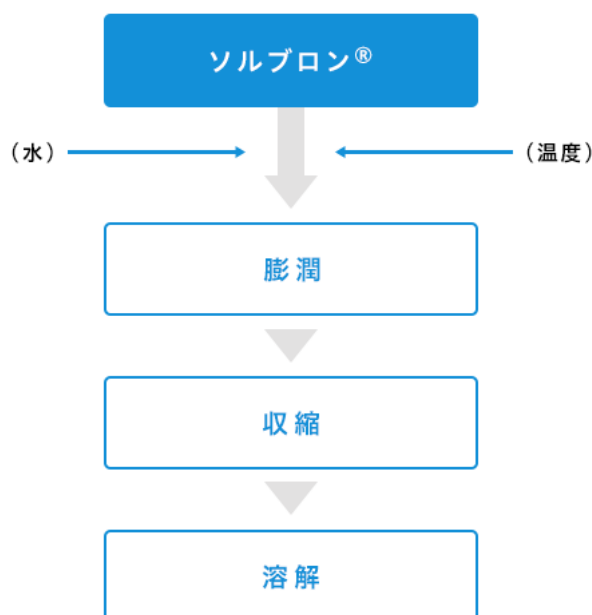


Fig. 2-3 用いた PVA 糸の溶解過程¹⁹⁾

2-3-2 浸潤速度調査

2-2、2-3-1 の方法で、ナイロン糸を組み込み作製したゲルシートから、糸を引き抜いた。ゲルシートの両端に穴を開け、色素液を流入させた (Fig. 2-4)。色素液は、Acid Red 18 (食用色素 赤: 共立食品株式会社)、Hemoglobin (Hemoglobin, Freeze Dried: MP Biomedicals)、顔料 (水性顔料 赤: シヤチハタ) の3つを用いた。Acid Red 18 の分子量は 562.51Da²⁰⁾、Hemoglobin の分子量は 64,500Da、顔料の大きさは、倒立顕微鏡 (株式会社ニコン) を用いて撮影、画像解析ソフト ImageJ (NIH) を用いて測定し、 $3.2 \pm 0.8 \mu\text{m}$ であった。

倒立顕微鏡を用いて、時間経過ごとに倍率 100 倍で撮影し、各画像について、流路の境目からの浸潤距離を、ImageJ を用いて左右合わせて 10 カ所測定した (Fig. 2-4)。ただし、顔料の浸潤距離については、左端から右端までの浸潤距離を 10 カ所測定し、浸潤速度を算出した。

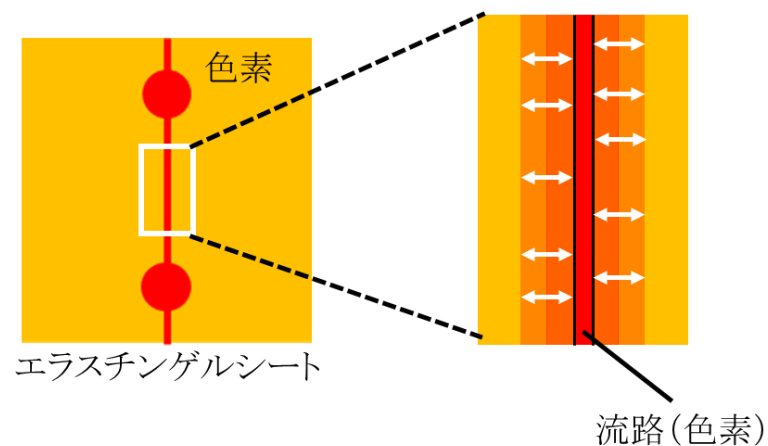


Fig. 2-4 浸潤距離測定位置 (白矢印)

2-3-3 糸の融合

複数本の PVA 糸から、分岐を作製するために、複数本を融合する方法について検討した。

【PVA 糸の蒸気融合: 直径・収縮率測定】

蒸気融合には、沸騰したお湯上の水蒸気を用いた。まず、水を沸騰させ、一点に穴の開いたアルミホイルをかぶせた。その上で、任意の本数の糸を3秒蒸気に当てた。その後、延伸させながら 30 秒ほど乾燥させた。これを 10 回繰り返し、糸を融合した。

・直径測定

融合した糸をスライドガラスに貼り付け、直径を測定した。

・収縮率測定

蒸気による糸の収縮率を測定した。

蒸気に当てる前後の長さを測定し、以下の式から、収縮率を算出した。

$$\{(\text{蒸気融合前}-\text{蒸気融合後})/\text{蒸気融合前}\} \times 100 = \text{収縮率}(\%)$$

【PVA 糸の光架橋融合:直径・収縮率・膨潤測定】

光架橋融合には、光架橋剤を用いた。1%の光架橋剤を糸に塗布し、UV を 1 分あてた。これを2回繰り返し、糸を融合した。

・直径測定

融合した糸をスライドガラスに貼り付け、直径を測定した。

・収縮率測定

光架橋による糸の収縮率を測定した。

光架橋融合の前後の長さを測定し、以下の式から、収縮率を算出した。

$$\{(\text{光架橋融合前}-\text{光架橋融合後})/\text{光架橋融合前}\} \times 100 = \text{収縮率}(\%)$$

・膨潤測定

収縮率測定後、脱イオン水を滴下し、時間経過ごとに直径を測定した。

融合させた糸は、ピンセットの重みで裂けるかを確認して、融合の可否を評価した。

2-3-4 分岐作製

流路の設計として、12 本の糸を1つの束にしたもの(以降、直線型と表記)・12 本束を 6 本と 6 本に分岐させたもの(以降、分岐1:1型と表記)、12 本束を 8 本と 4 本に分岐させたもの(以降、分岐 2:1 型と表記)の3パターン作製した(Fig. 2-5)。糸の融合は光架橋により行った。

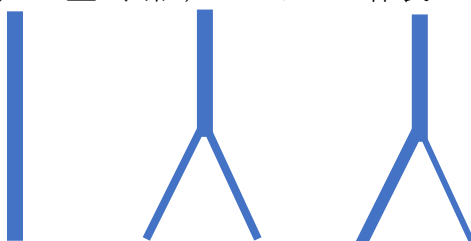


Fig. 2-5 流路鋳型模式図

左から直線型、分岐1:1型、分岐 2:1 型

色素流入の接合部のために、Fig. 2-5 の上側にマイクロシリコンチューブ(内径 100 μm 、外径 200 μm)を挿入し、2-1 の手順でゲルシートを作製した。

2-4 流速測定

2-4-1 直線・分岐時の流速測定

シリンジポンプを用いて、一定速度で色素を流入した (Fig. 2-6A)。写真 (Fig. 2-6B) のゲルシートの上から出てきた色素を、あらかじめ重さを測定しておいた紙で吸い取り (Fig. 2-6C)、重さを計量し、その差から流速を算出した。

シリンジポンプの設定値は、流速約 $3\mu\text{L}/\text{min}$ で以降の実験を行った。

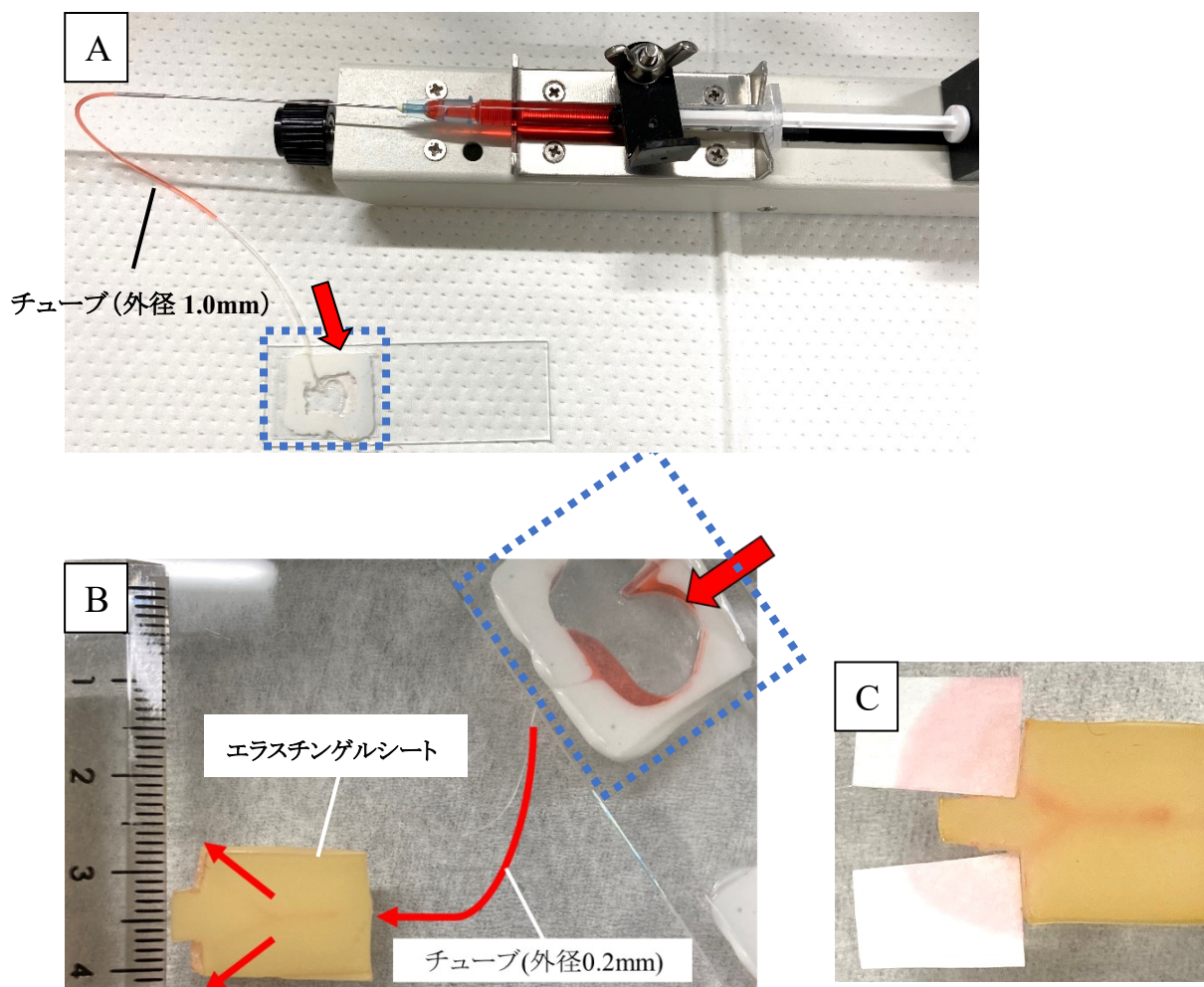


Fig. 2-6 色素流入方法 (赤矢印: 色素液の流れ)
(A)シリンジポンプ、(B)ゲルへの流入部、(C)吸水方法

2-4-2 歪み条件下の流速測定

エラスチンゲルシートの両側を引張、固定した。シリンジポンプを用いて、一定速度で色素を流入した (Fig. 2-7,8,9)。2-4-1と同様に、出てきた色素を、あらかじめ重さを測定しておいた紙で吸い取り、重さを計量し、その差から流速を算出した。歪みの割合 (伸長率) は、7%、14%、21%で行った。

$$\text{伸長率}(\%) = (\text{自然長からの伸び} / \text{自然長}) \times 100$$

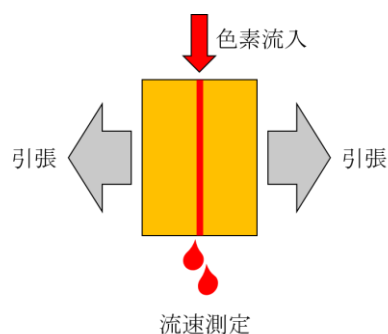


Fig. 2-7 色素流入方法

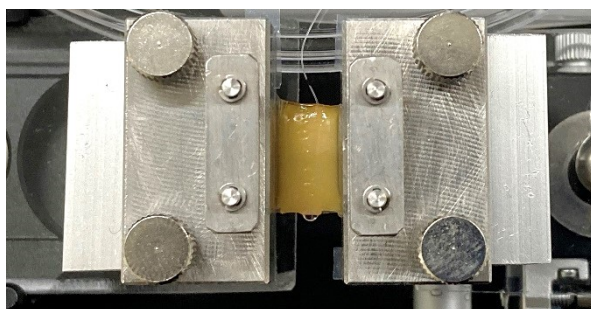


Fig. 2-8 延伸装置図(上から)

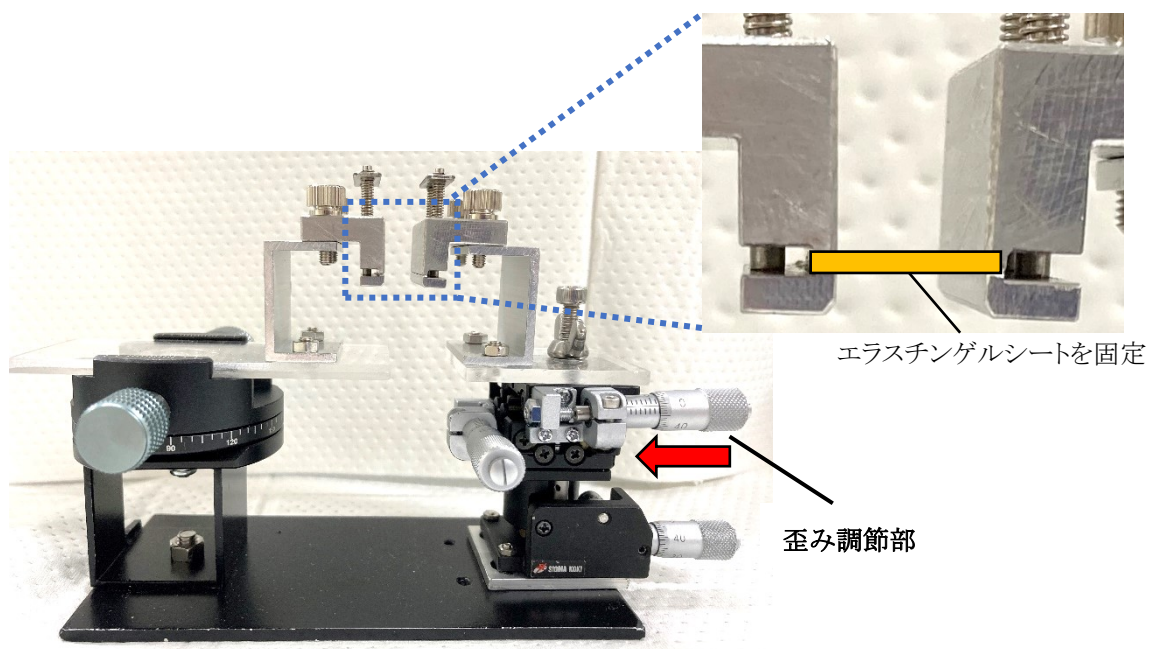


Fig. 2-9 延伸装置図(横から)

2-4-3 歪み条件下の圧力測定

原理としては、まず、Fig. 2-10 の赤矢印の方向(エラスチンゲルシート)へ向かって流れていく。このとき、灌流中に圧力抵抗が発生すると、青矢印の方向に力がはたらく。この圧力を検出した。

方法は、2-4-2と同様に、エラスチンゲルシートの両側を引張、固定した。圧力測定のため、シリンジと針の間に三方弁を取り付け、圧力測定装置(GP-M010:KEYENCE)とつなぎ、データロガー(C-LOGGER:KEYENCE)により数値を記録した。接続チューブ内はあらかじめ水で満たした(Fig. 2-10)。シリンジポンプを用いて、一定速度で色素を流入した。歪みの割合(伸長率)は、7%、14%、21%で行った。

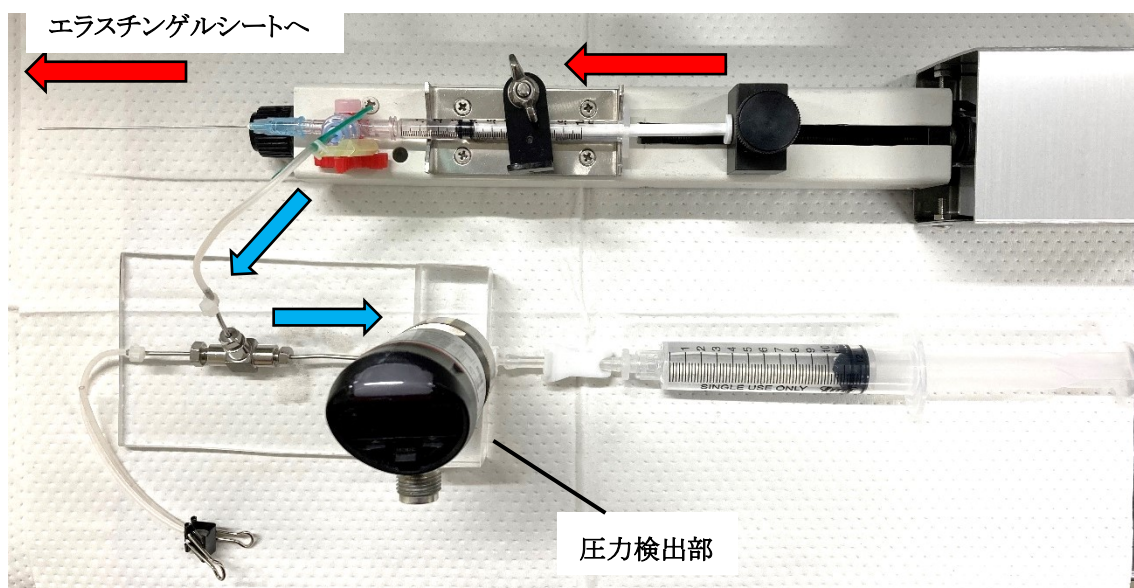


Fig. 2-10 圧力測定装置

赤矢印:色素液の流れ、青矢印:圧力抵抗の向き

2-5 統計処理

統計解析ソフト StatView -J 5.0 (SAS Institute) を使用して、有意性を評価した。解析方法には、Tukey-Kramer 法を使って、 p 値 <0.05 を有意とした。有意な差が認められた結果のグラフには、* : $p<0.05$ 、** : $p<0.01$ と表記した。

3. 結果

3-1 エラスチンゲルシートの評価

3-1-1 各組成のエラスチンゲルの構造評価

エラスチン A ゲルとエラスチン A:E=50:50 ゲルの構造を以下に示した (Fig. 3-1)。

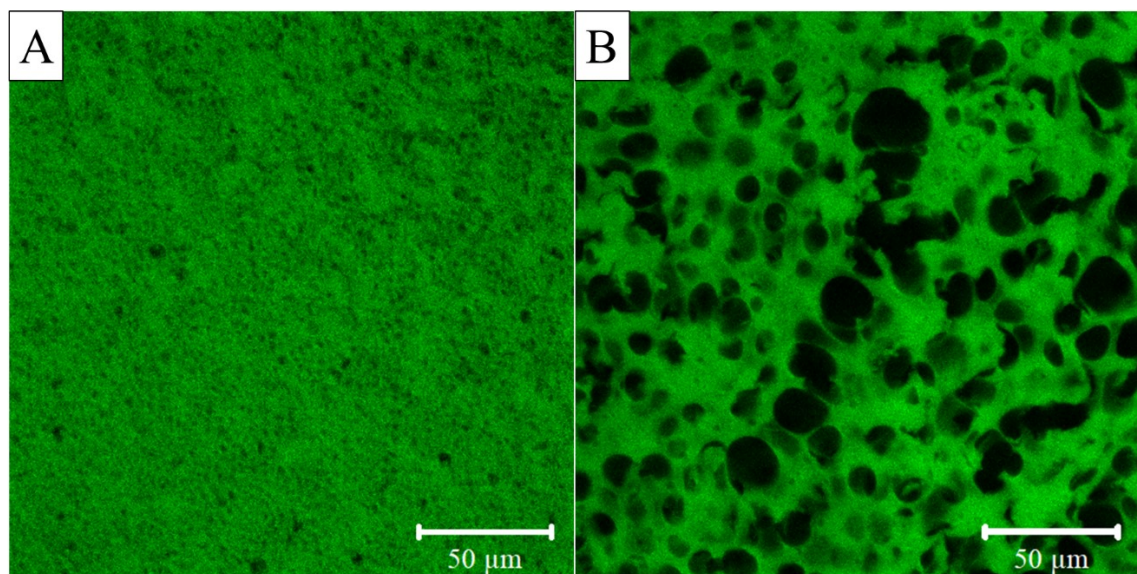


Fig. 3-1 (A)エラスチン A ゲルと(B)エラスチン A:E=50:50 ゲルの共焦点レーザー顕微鏡画像

Table 3-1 エラスチン A と E の混合比率を変えた時の孔径

A:E	100:0	75:25	66:33	50:50
孔径(μm)	0.99 ± 0.38	6.7 ± 1.2	9.6 ± 2.9	10.6 ± 4.8

エラスチン A にエラスチン E を加えてゲルを作製することで、細孔が観察された (Fig. 3-1B)。特に、A:E=50:50 のとき、孔径が $10.6 \pm 4.8 \mu\text{m}$ となり、毛細血管径の最も細い部分の約 $10 \mu\text{m}$ と近い値であった (Table 3-1)。

次に、エラスチン A と E の混合比率を変えた時の孔径分布を、縦軸を孔径として以下のグラフに示した (Fig. 3-2)。

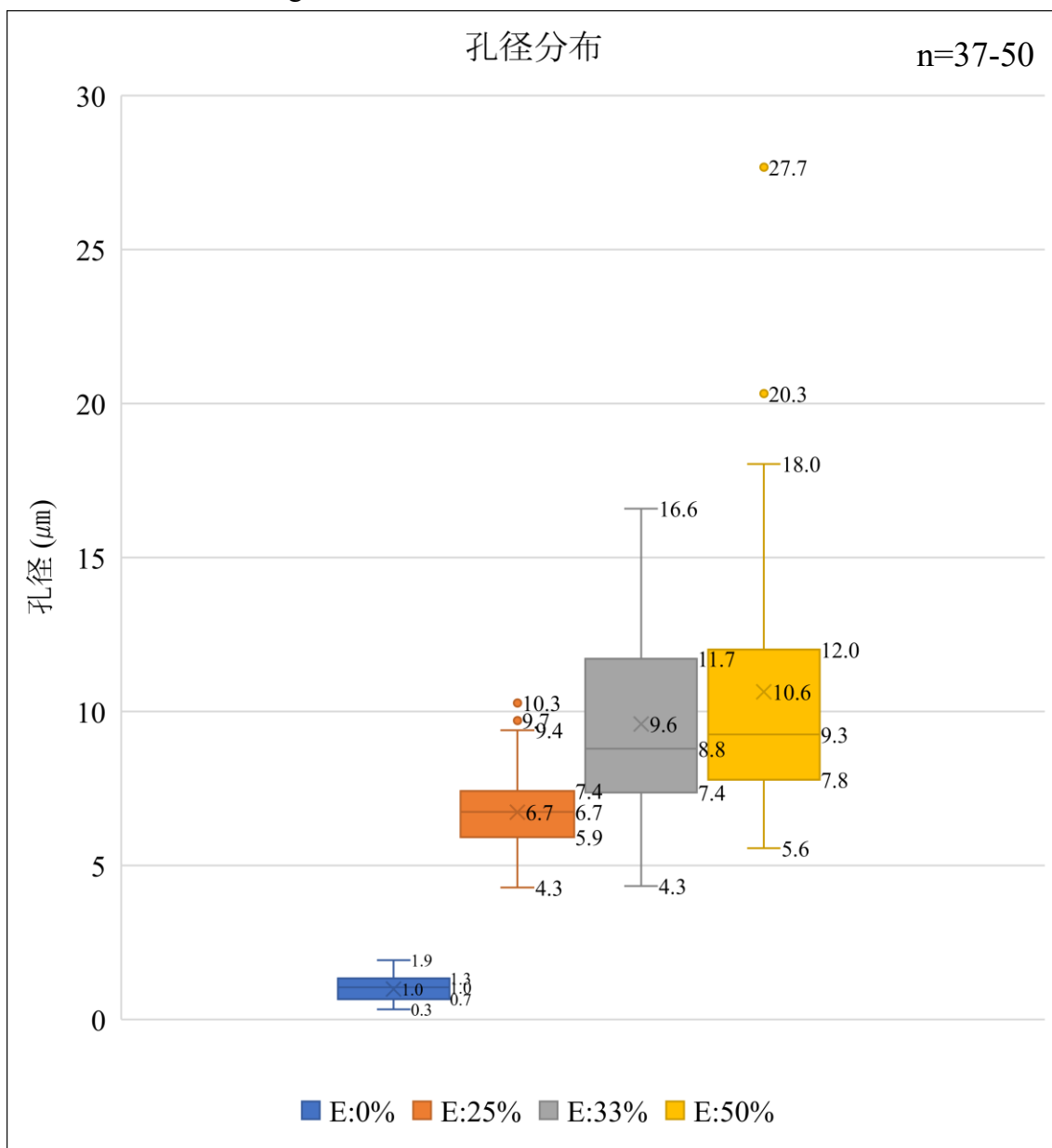


Fig. 3-2 エラスチン A と E の混合比率を変えた時の孔径分布

エラスチン E が 0% の時、孔径中央値は $1.0\mu\text{m}$ で、四分位範囲は $0.7\sim 1.3\mu\text{m}$ 、エラスチン E が 25% の時、孔径中央値は $6.7\mu\text{m}$ で、四分位範囲は $5.9\sim 7.4\mu\text{m}$ 、エラスチン E が 33% の時、孔径中央値は $8.8\mu\text{m}$ で、四分位範囲は $7.4\sim 11.7\mu\text{m}$ 、エラスチン E が 50% の時、孔径中央値は $9.3\mu\text{m}$ で、四分位範囲は $7.8\sim 12.0\mu\text{m}$ であった。

エラスチン E の配合比率が増加するにつれて、孔径中央値も大きくなっていった。

また、エラスチン E の混合比率が 50% の時、孔径中央値は $9.3\mu\text{m}$ で、四分位範囲は $7.8\sim 12.0\mu\text{m}$ であったことから、 $10\mu\text{m}$ 付近への孔径分布の集中が確認された。

3-1-2 各エラスチンシートでの浸潤速度

【エラスチン A ゲルシートへの Acid Red 18 の浸潤】

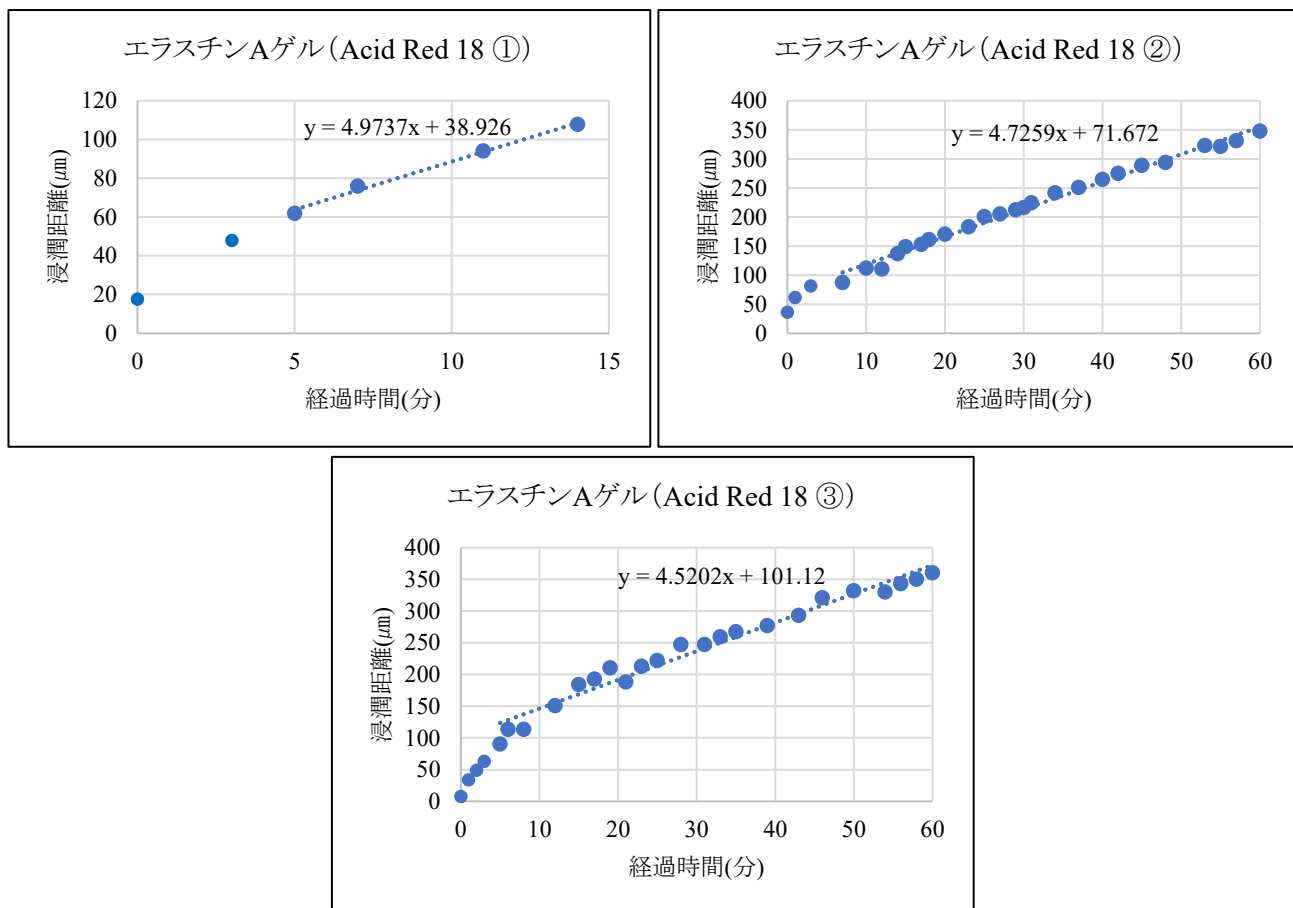


Fig. 3-3 エラスチン A ゲルシートへの Acid Red 18 の浸潤

浸潤速度の平均は、 $4.7 \pm 0.23 \mu\text{m}/\text{分}$ であった (Fig. 3-3)。

【エラスチン AE ゲルシートへの Acid Red 18 の浸潤】

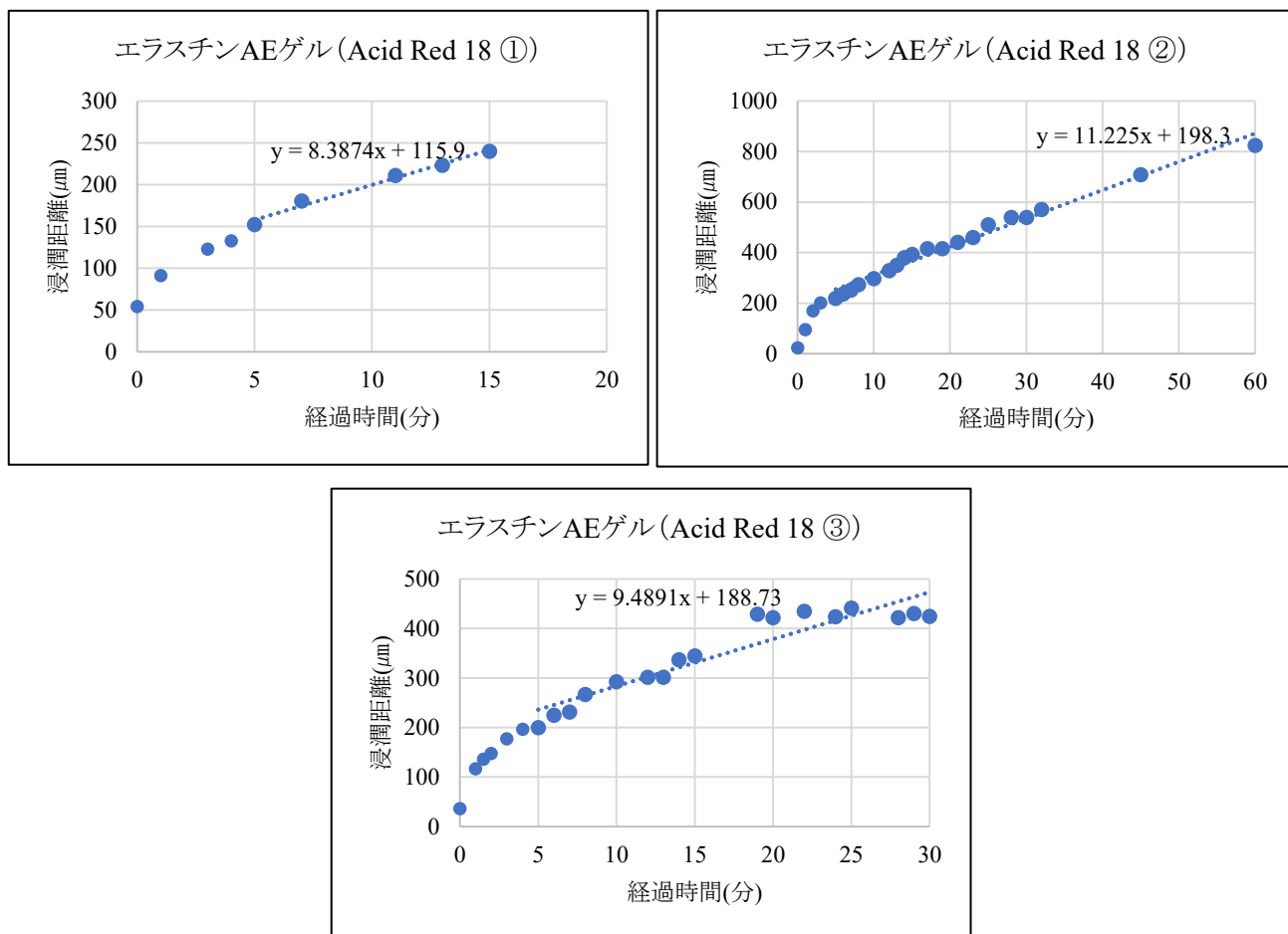


Fig. 3-4 エラスチン AE ゲルシートへの Acid Red 18 の浸潤
浸潤速度の平均は、 $9.7 \pm 1.43 \mu\text{m}/\text{分}$ であった (Fig. 3-4)。

【エラスチン A ゲルシートへの Hemoglobin の浸潤】

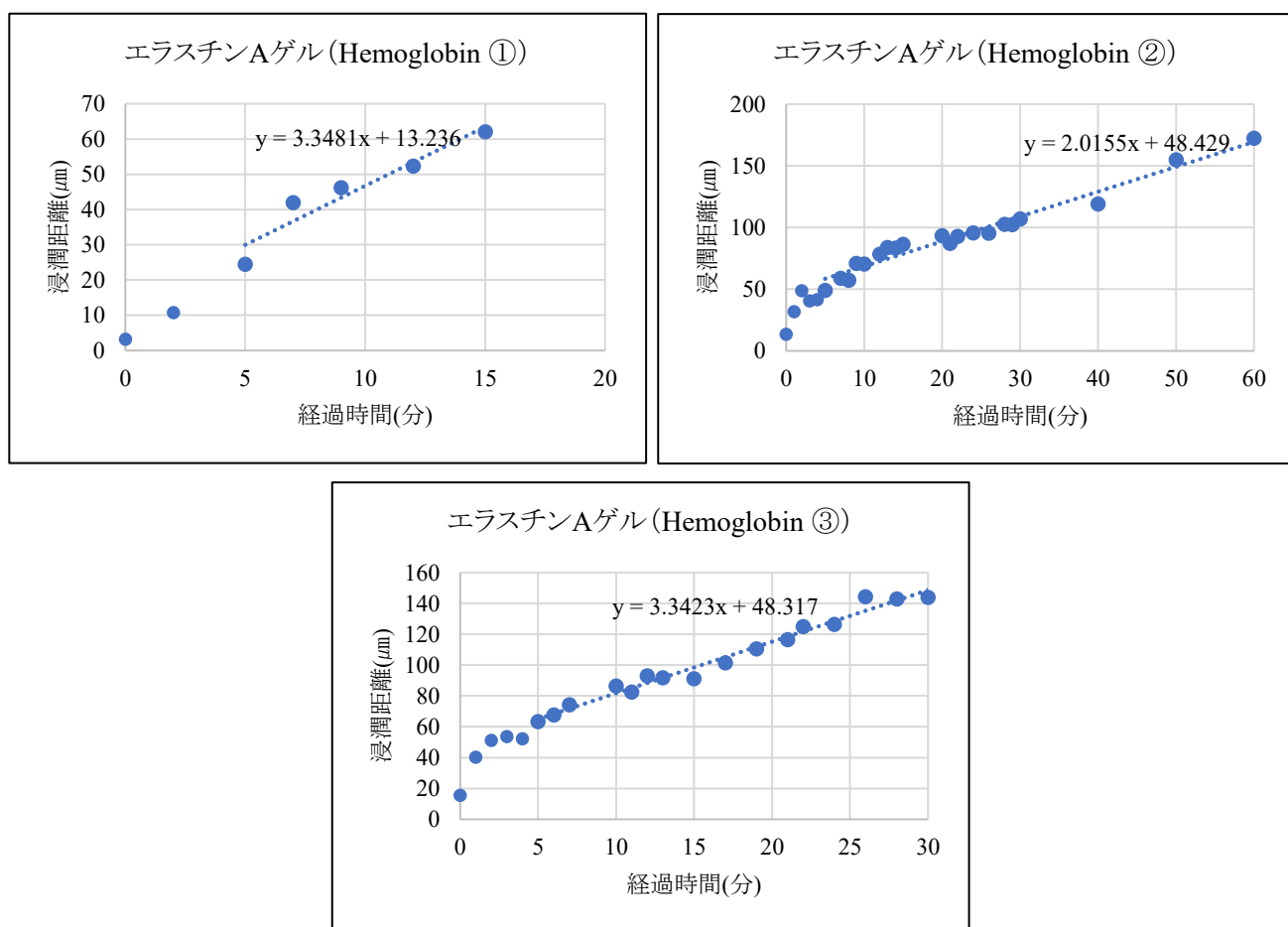


Fig. 3-5 エラスチン A ゲルシートへの Hemoglobin の浸潤

浸潤速度の平均は、 $2.9 \pm 0.77 \mu\text{m}/\text{分}$ であった (Fig. 3-5)。

【エラスチン AE ゲルシートへの Hemoglobin の浸潤】

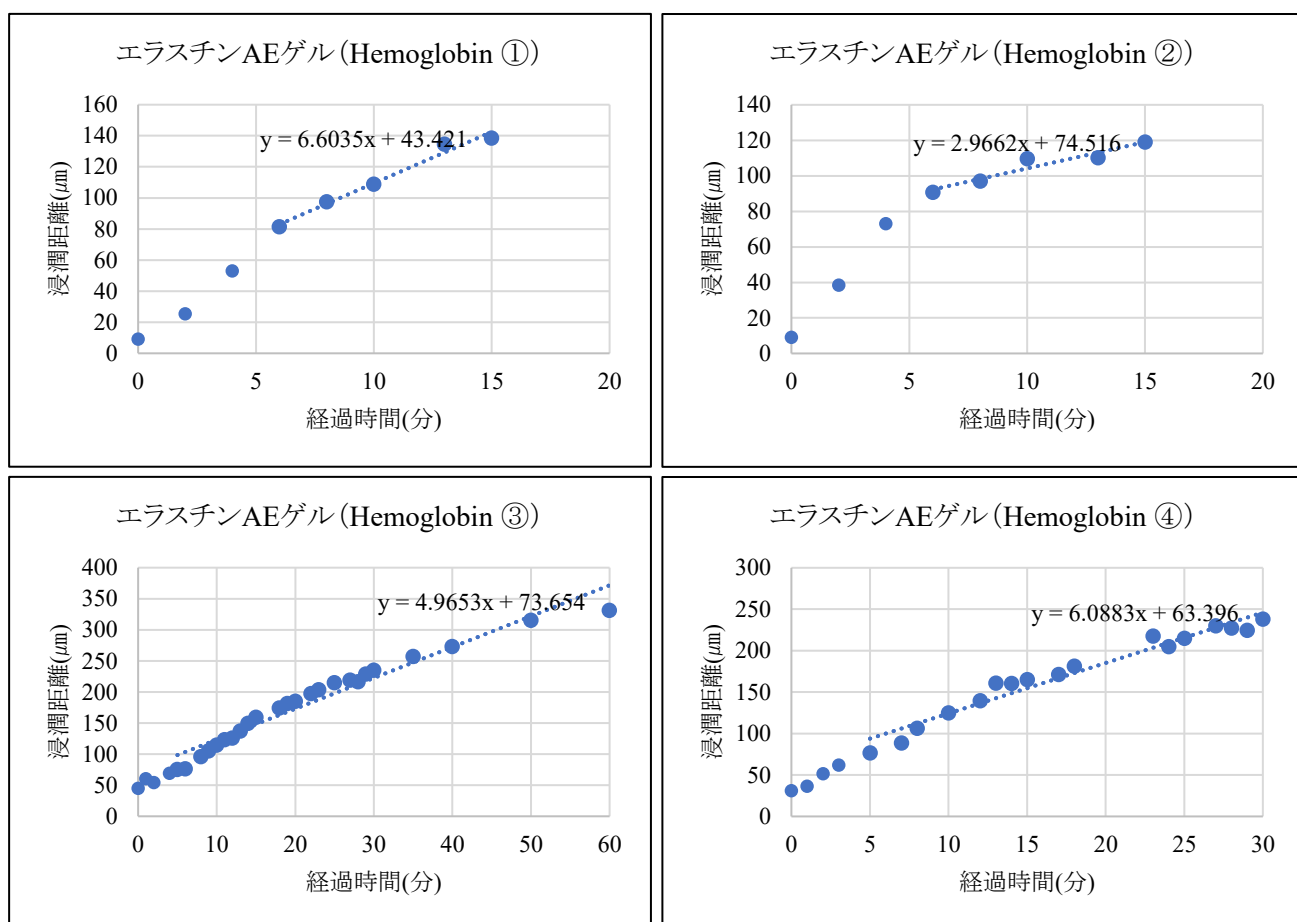


Fig. 3-6 エラスチン AE ゲルシートへの Hemoglobin の浸潤

浸潤速度の平均は、 $5.2 \pm 1.61 \mu\text{m}/\text{分}$ であった (Fig. 3-6)。

【エラスチン A ゲルシートへの顔料の浸潤】

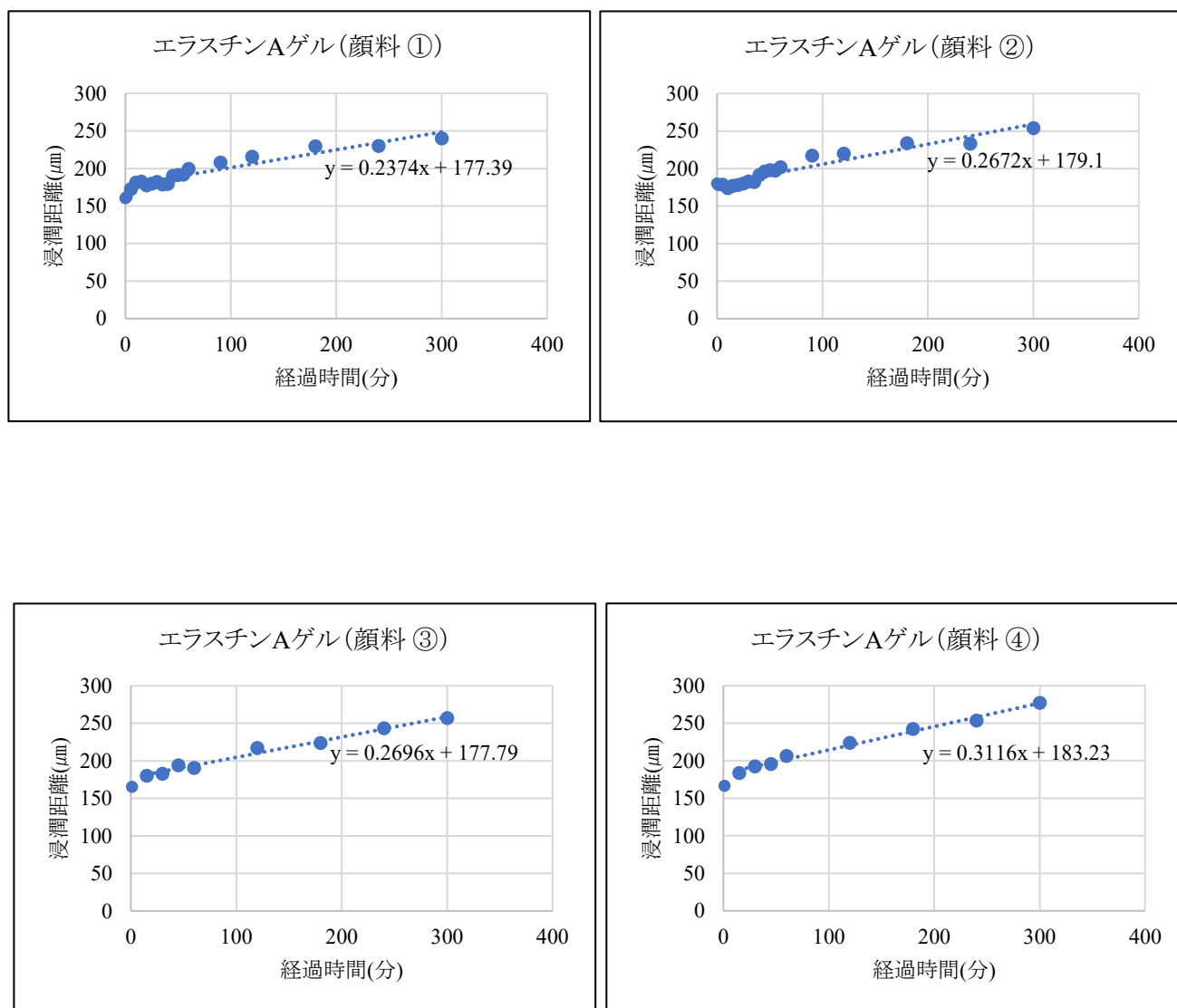


Fig. 3-7 エラスチン A ゲルシートへの顔料の浸潤

浸潤速度の平均は、 $0.3 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{分}$ であった (Fig. 3-7)。

【エラスチン AE ゲルシートへの顔料の浸潤】

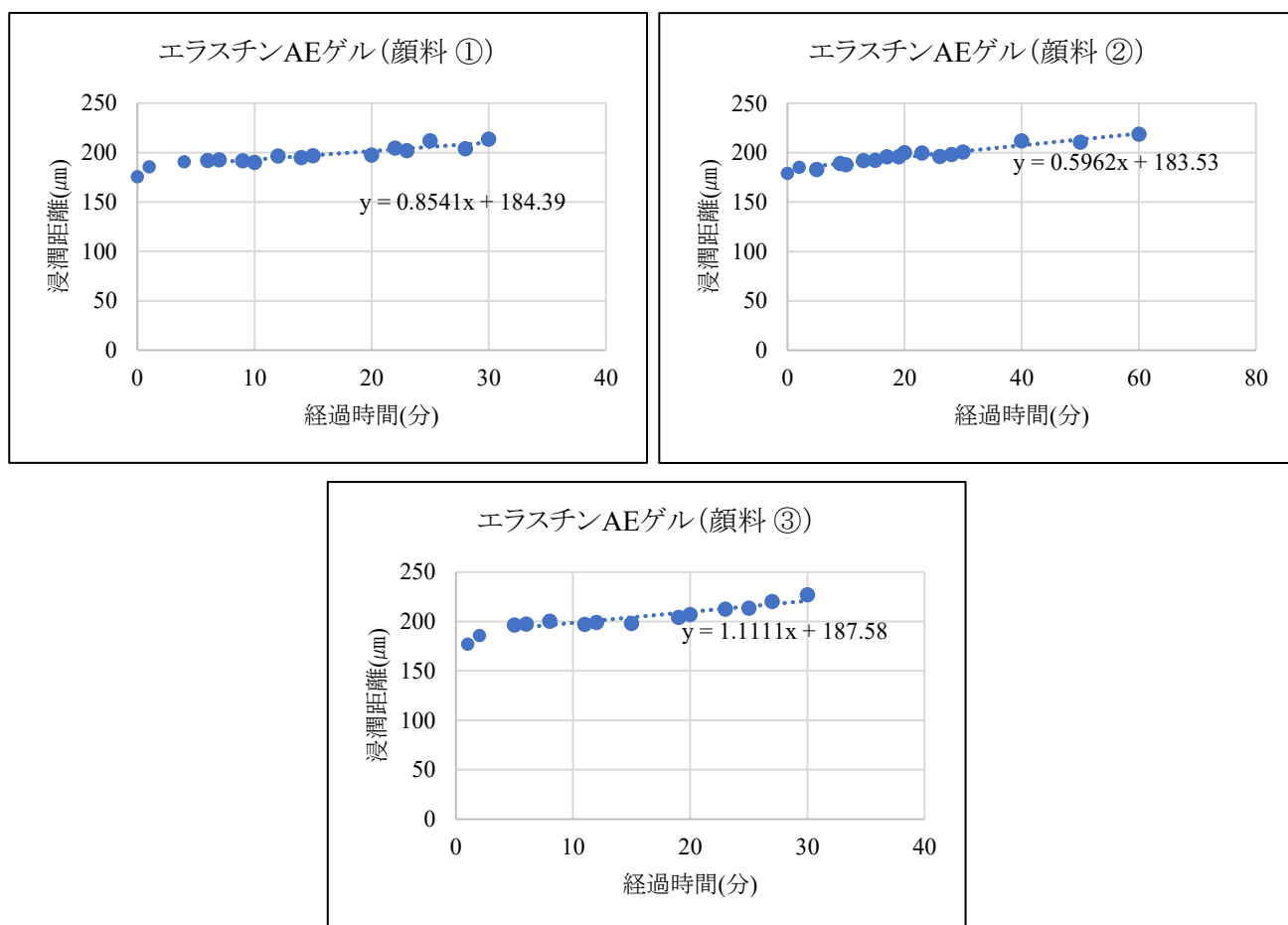


Fig. 3-8 エラスチン AE ゲルシートへの顔料の浸潤

浸潤速度の平均は、 $0.8 \pm 0.25 \mu\text{m}/\text{分}$ であった (Fig. 3-8)。

3-1-3 浸潤速度のまとめ

3-1-2 のグラフにおける傾きの値を浸潤速度とし、以下の棒グラフにまとめた (Fig. 3-9)。

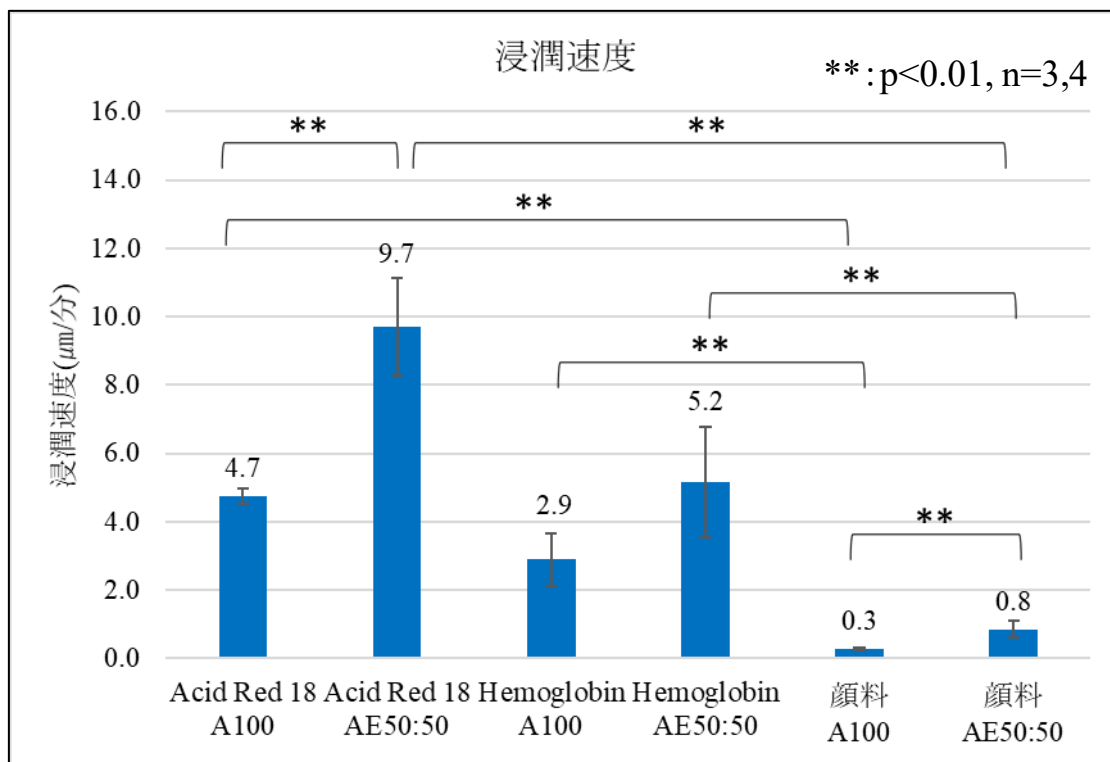


Fig. 3-9 浸潤速度

Acid Red 18 について、エラスチン A ゲルシートでは $4.7 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{分}$ 、AE ゲルシートでは $9.7 \pm 1.4 \mu\text{m}/\text{分}$ となり、AE ゲルシートの方が浸潤速度が大きかった。

Hemoglobin についても、エラスチン A ゲルシートでは $2.9 \pm 0.8 \mu\text{m}/\text{分}$ 、AE ゲルシートでは $5.2 \pm 1.6 \mu\text{m}/\text{分}$ となり、AE ゲルシートの方が浸潤速度が大きかった。

顔料についても、エラスチン A ゲルシートでは $0.3 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{分}$ 、AE ゲルシートでは $0.8 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{分}$ となり、AE ゲルシートの方が浸潤速度が大きかった。

また、エラスチン A ゲルシートについて、Acid Red 18 では $4.7 \pm 0.2 \mu\text{m}/\text{分}$ 、Hemoglobin では $2.9 \pm 0.8 \mu\text{m}/\text{分}$ 、顔料では $0.3 \pm 0.03 \mu\text{m}/\text{分}$ となり、Acid Red 18、Hemoglobin、顔料の順に浸潤速度が小さくなった。

エラスチン AE ゲルシートについても、Acid Red 18 では $9.7 \pm 1.4 \mu\text{m}/\text{分}$ 、Hemoglobin では $5.2 \pm 1.6 \mu\text{m}/\text{分}$ 、顔料では $0.8 \pm 0.3 \mu\text{m}/\text{分}$ となり、Acid Red 18、Hemoglobin、顔料の順に浸潤速度が小さくなった。

以上より、どの色素においても、エラスチン AE 混合ゲルの方が浸潤速度が大きく、組成が同じゲルシート間では、Acid Red 18、Hemoglobin、顔料の順に浸潤速度が小さくなることが分かった。

3-2 流路の複雑化検討

3-2-1 蒸気による融合

まず作製した糸はピンセットの重みで裂けなかったことから融合できていたことを確認した。続いて、糸の直径変化・収縮率について以下に示す。

まず、蒸気融合前と融合後の PVA 糸の直径が変化するかを調査した。また、本数が異なる場合の融合後の直径変化についても測定した。

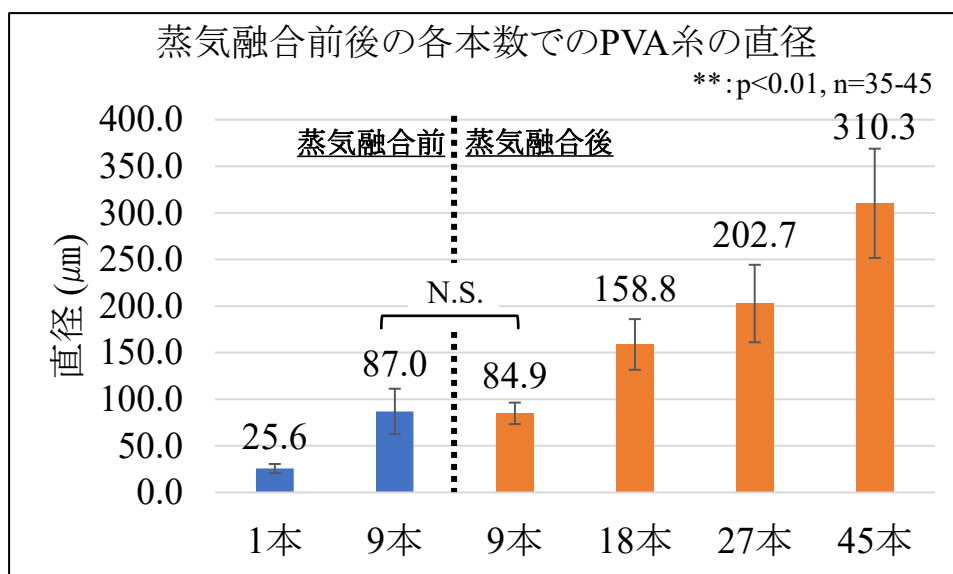


Fig. 3-10 蒸気融合前後の各本数での PVA 糸の直径

9本束において、融合前と融合後で比較した場合、融合前は、 $87.0 \pm 24.3 \mu\text{m}$ 、融合後は、 $84.9 \pm 11.5 \mu\text{m}$ と大きな差は見られなかった (Fig. 3-10)。

融合後の糸について、本数を変化させた場合の関係を以下 (Fig. 3-11) に示した。

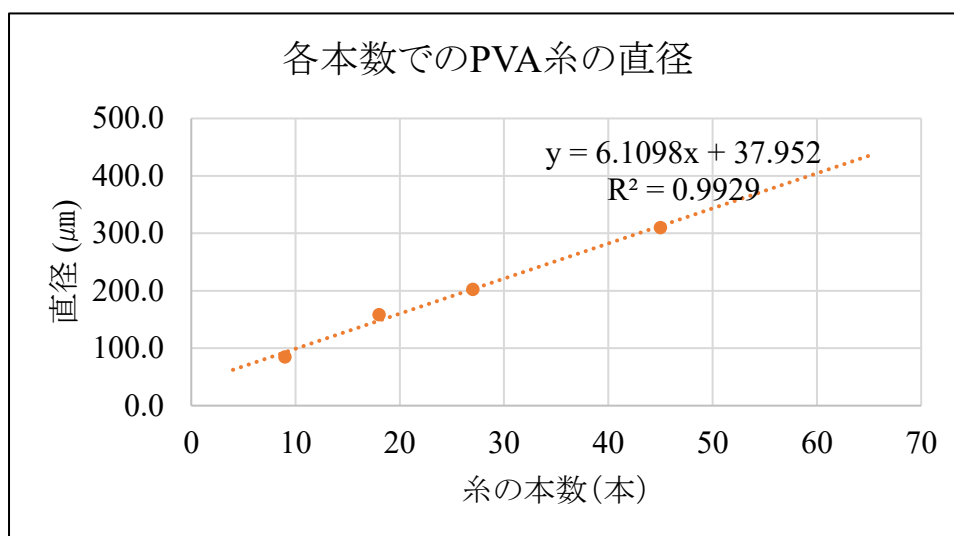


Fig. 3-11 蒸気融合後におけるPVA糸の本数と直径の関係

本数を増やしていった場合、糸の本数に比例して、直径が変化することが確認された(Fig. 3-11)。

次に、蒸気融合時のPVA糸の収縮について調査した。

2-3-1 で示したように、PVA糸は、溶解前に収縮するという性質がある。そのため、溶解直前で融合させる蒸気融合においては、糸の収縮を伴う。そこで、各本数における収縮率を調査し、以下に示した(Fig. 3-12)。

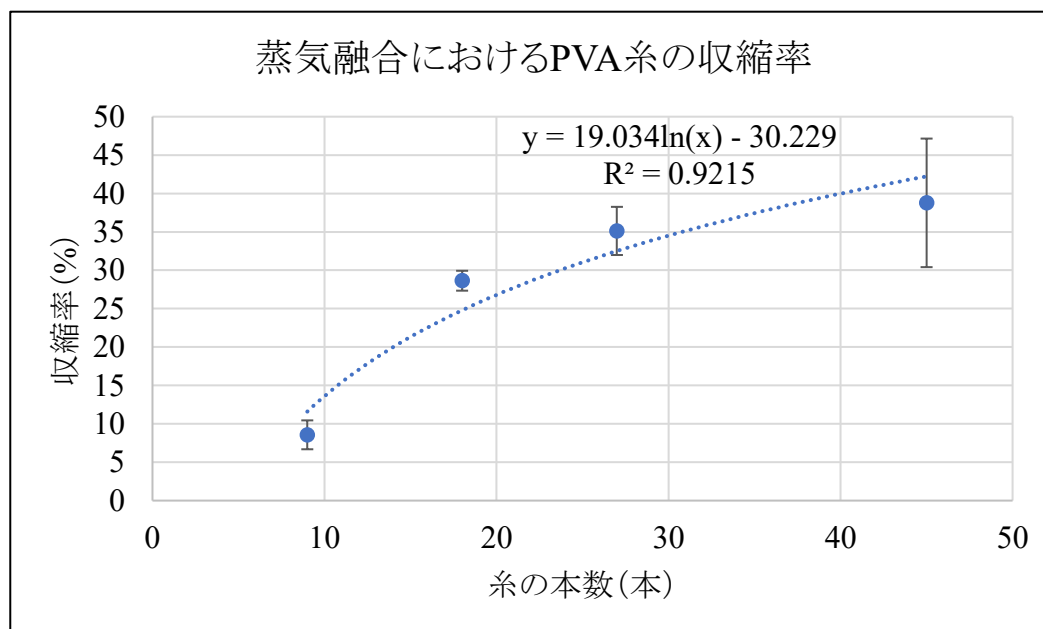


Fig. 3-12 蒸気融合におけるPVA糸の収縮率

糸の本数が9, 18, 27, 45本と増えると、収縮率も $8.6 \pm 1.9\%$, $28.6 \pm 1.3\%$, $35.1 \pm 3.1\%$, $38.8 \pm 8.4\%$ と大きくなるという傾向が得られた。

3-2-2 光架橋剤による融合

架橋時と未架橋時の直径を調査した。

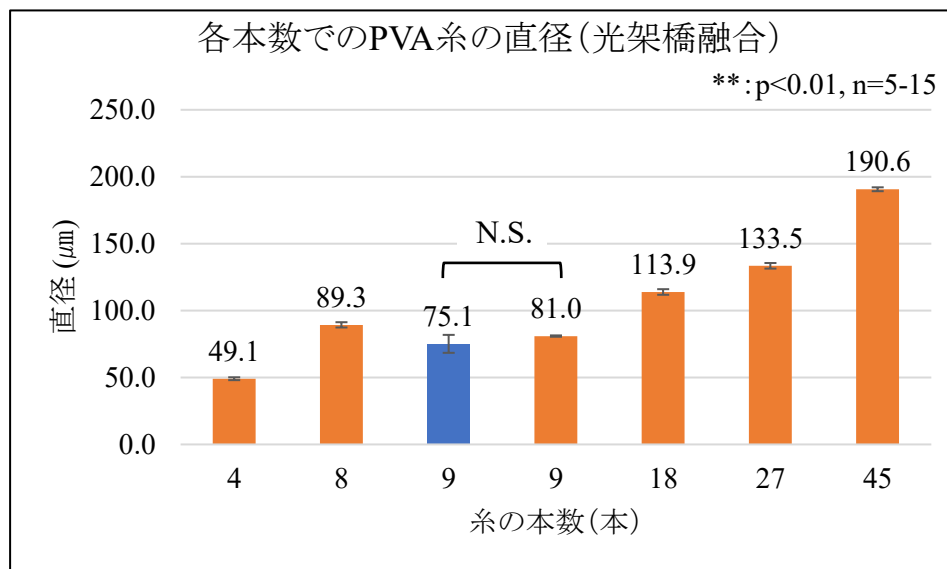


Fig. 3-13 光架橋時・未架橋時の各本数での PVA 糸の直径
(青:未架橋、オレンジ:架橋)

9 本束において、未架橋時・光架橋時で比較した場合、未架橋時は、 $75.1 \pm 6.7 \mu\text{m}$ 、架橋時は、 $81.0 \pm 0.5 \mu\text{m}$ と大きな差は見られなかった。(Fig. 3-13)。

光架橋時の糸について、本数を変化させた場合の関係を以下 (Fig. 3-14) に示した。

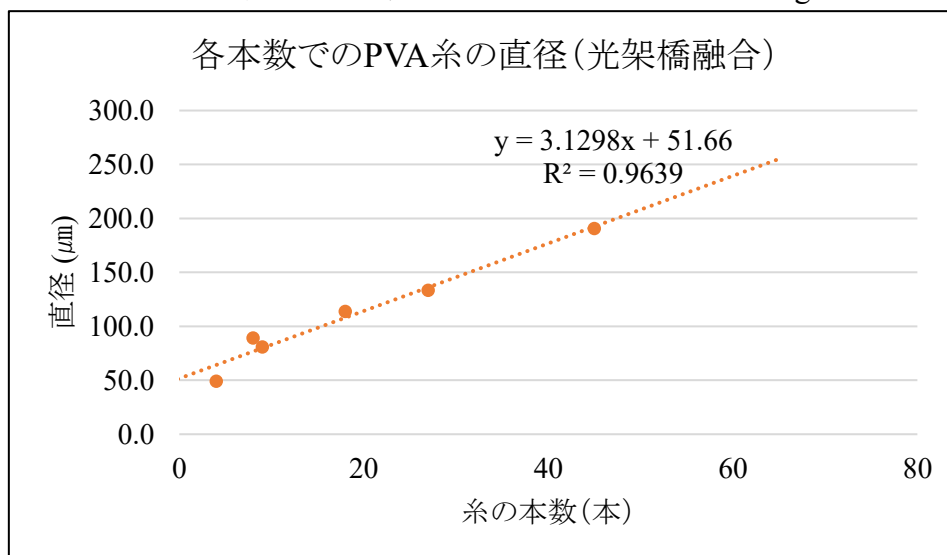


Fig. 3-14 光架橋時における PVA 糸の本数と直径の関係

本数を増やしていった場合、糸の本数に比例して、直径が変化することが確認された (Fig. 3-14)。

次に、光架橋時の糸の長さの収縮率を測定したが、架橋時に収縮は見られなかった (Table 3-2)。

Table 3-2 光架橋融合時の糸の収縮率

糸の本数(本)	4	8	9	18	27	45
収縮率(%)	0	0	0	0	0	0

最後に、光架橋後、脱イオン水中で 30 分間静置した際の、時間経過に伴う直径変化を以下のグラフに示した (Fig. 3-15)。

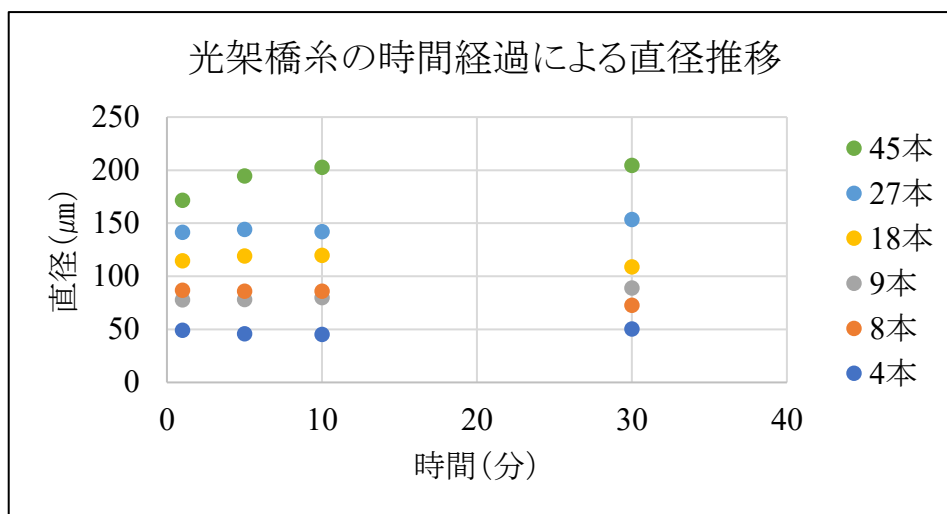


Fig. 3-15 光架橋融合における脱イオン水滴下時 PVA 糸の直径推移

4, 8, 9, 18, 27, 45 本の全てにおいて、大きな直径の変化は無く、架橋状態を維持した。

光架橋前と光架橋後脱イオン水中 30 分静置した糸の長さの比から収縮率を以下に示した (Fig. 3-16)。

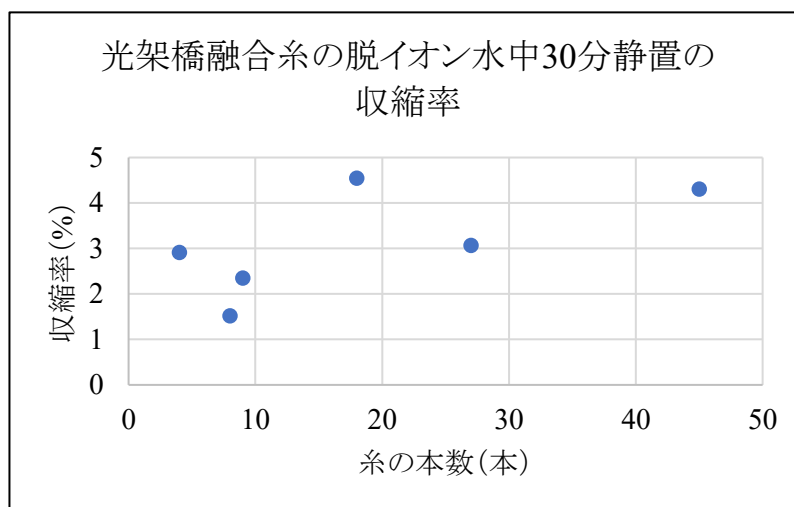


Fig. 3-16 光架橋融合糸の脱イオン水中 30 分静置の収縮率

収縮率は、どの糸の本数でも 5%以下であった。

光架橋剤を用いて融合すると、脱イオン水を滴下しても、直径の変化が少ないことが確認され、融合の有効性が確認された。

3-2-3 光架橋剤による融合糸のゲル内留置

作製した光架橋融合糸を、エラスチン A ゲルシート内に留置し、97℃以上の熱湯に浸漬させ、糸を溶解させた。その時の、糸の直径と作製したゲルに空いた穴の直径を以下に示した (Fig. 3-17)。

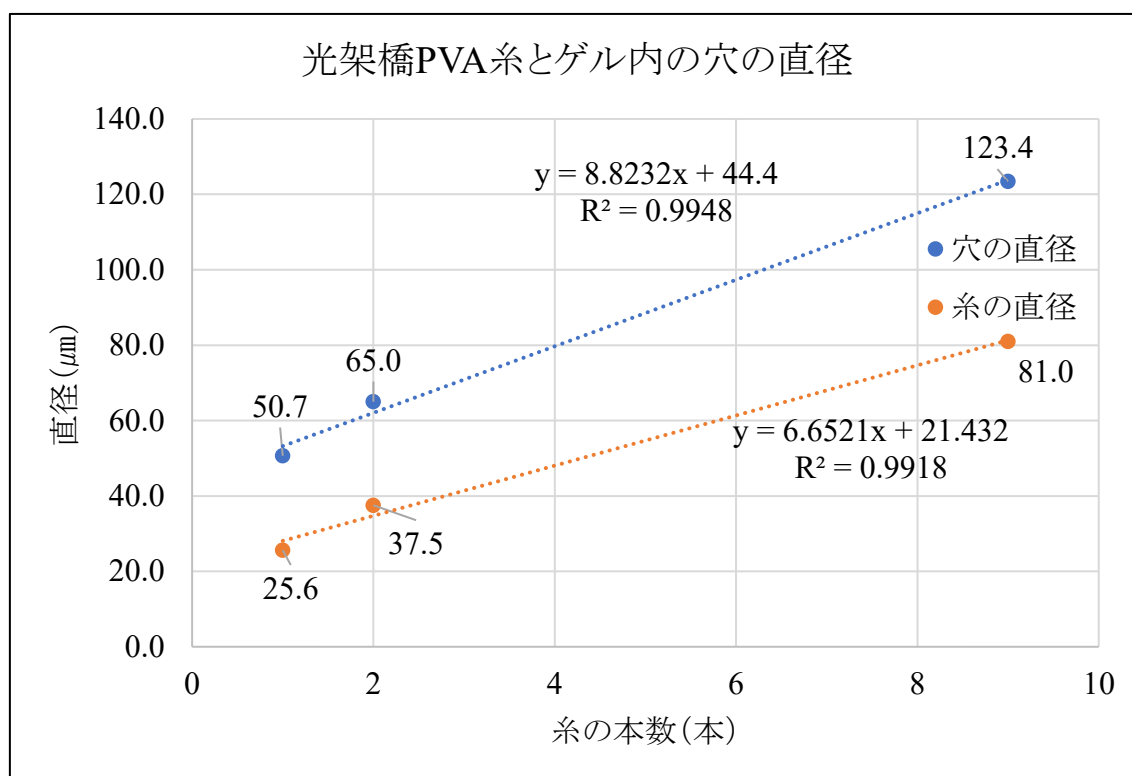


Fig. 3-17 光架橋 PVA 糸とゲル内の穴の直径

糸の直径に対して、穴の直径が大きくなるという傾向が得られた。

1 本の時は糸の直径の 2.0 倍、2 本の時は 1.7 倍、9 本の時は 1.5 倍であった。

また、糸の本数の増加に対して、穴の直径・糸の直径はそれぞれ比例関係にあった。

3-3 流速測定

3-3-1 直線・分岐時の流速

各種流路を作製した (Fig. 3-18)。

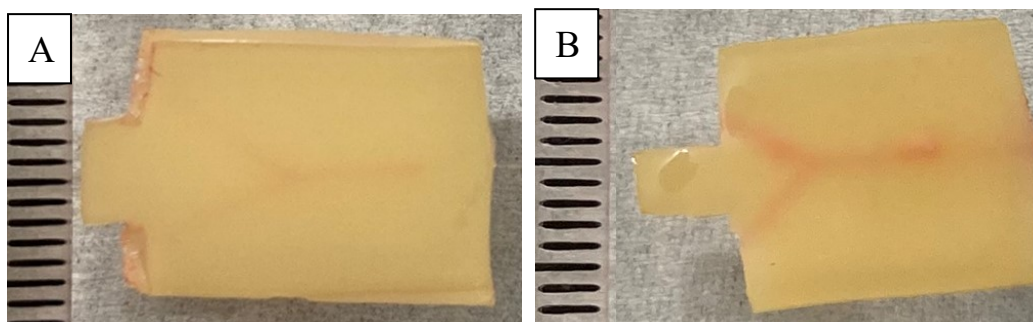


Fig. 3-18 (A)分岐 1:1 型、(B)分岐 2:1 型

作製した 3 パターンの流路について、流速を測定し、以下に示した (Fig. 3-19)。

直線型においては、 $3.22 \pm 0.9 \mu\text{L}/\text{min}$ となり、設定値の $3 \mu\text{L}/\text{min}$ と近い値をとった。

また、分岐 1:1 型については、流速の比は $1.28 (\mu\text{L}/\text{min}) : 1.20 (\mu\text{L}/\text{min})$ でおおよそ 1:1 となり、分岐 2:1 型については、流速の比は $1.98 (\mu\text{L}/\text{min}) : 0.82 (\mu\text{L}/\text{min})$ でおおよそ 2:1 になった。

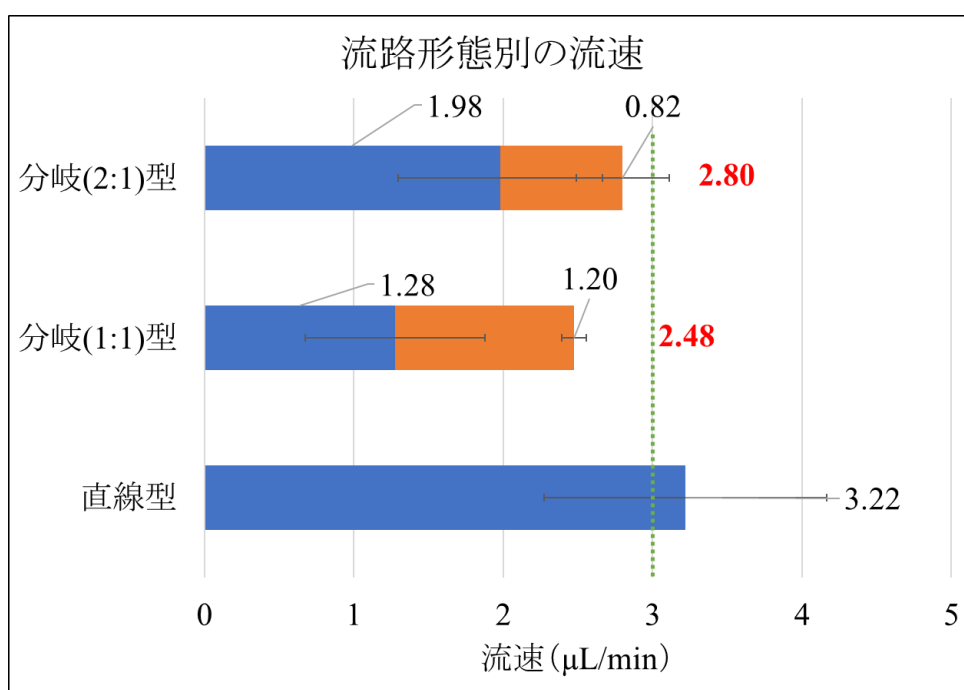


Fig. 3-19 流路形態別の流速 (3 パターン)

3-3-2 歪み条件下の流速

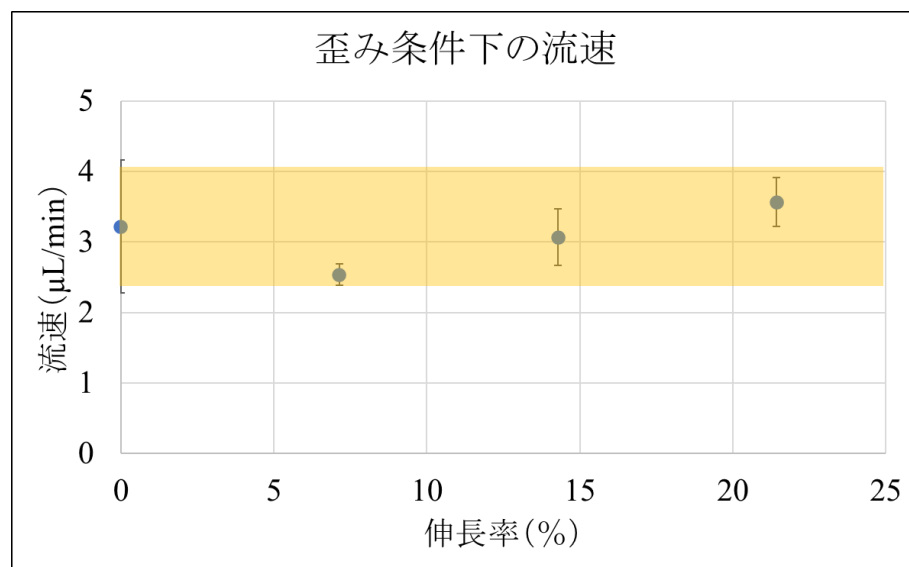


Fig. 3-20 歪み条件下の流速
黄色網掛け部:歪み 0%時の流速誤差範囲

横軸が伸長率、縦軸が流速として、各歪み条件下での流速をグラフに示した (Fig. 3-20)。結果としては、歪みを加えても、流速設定値の $3\mu\text{L}/\text{min}$ と近いことから、流速が保たれることが示唆された。

3-3-3 歪み条件下の圧力測定

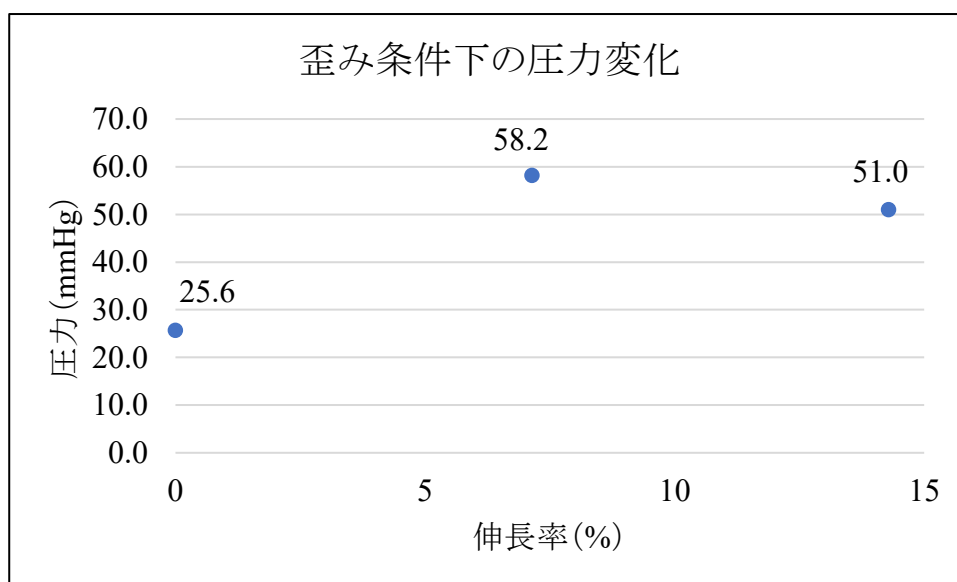


Fig. 3-21 歪み条件下の圧力変化

横軸が伸長率、縦軸が圧力 (mmHg) として、歪み条件下の圧力変化をグラフに示した (Fig. 3-21)。伸長率が 0% の時は、 25.6mmHg であったのに対して、伸長率が

7%, 14%の時は、それぞれ 58.2mmHg, 51.0mmHg、つまり、2.3 倍, 2.0 倍の圧力変化があった。

4. 考察

4-1 各条件のエラスチンゲルシートでの浸潤速度に関して

今回作製したシート状エラスチンゲル足場の構造と浸潤速度の関係について考察する。浸潤速度測定の結果より、シート状エラスチン A ゲル足場と AE 混合ゲル足場を比較すると、Acid Red 18・ヘモグロビン・顔料のどれにおいても、AE 混合ゲル足場の方が浸潤しやすいことがわかる。これは、Table 3-1 の結果の AE ゲル足場には約 10 μm の細孔が観察されたことから考えると、この細孔は連続的であり、空隙が色素溶液の浸潤の通路として機能したと考えられる。この空隙は、ゲル化するエラスチン A とゲル化しないエラスチン E の混合により相分離が生じ、AE 混合ゲル作製後に、脱イオン水中での洗浄中に、エラスチン E 部位が流出することによる生じた連続孔であると考えられる。すなわち、今回用いた色素を細胞培養培地に置き換えて考えると、AE 混合ゲルを用いることで培地成分や酸素などの浸潤と、細胞の産生する物質や代謝産物などの物質交換が充分可能であることが示唆された。

また、同一組成のゲル足場において、Acid Red 18 とヘモグロビンと顔料の浸潤速度の差について考察する。

Acid Red 18 とヘモグロビンと顔料の違いとして、分子サイズの違いが挙げられる。

粒子径について、Acid Red 18 は 1.42nm²¹⁾、ヘモグロビンは 7nm²²⁾、測定値より顔料は 3171nm と仮定して、浸潤速度との関係を以下に示した。

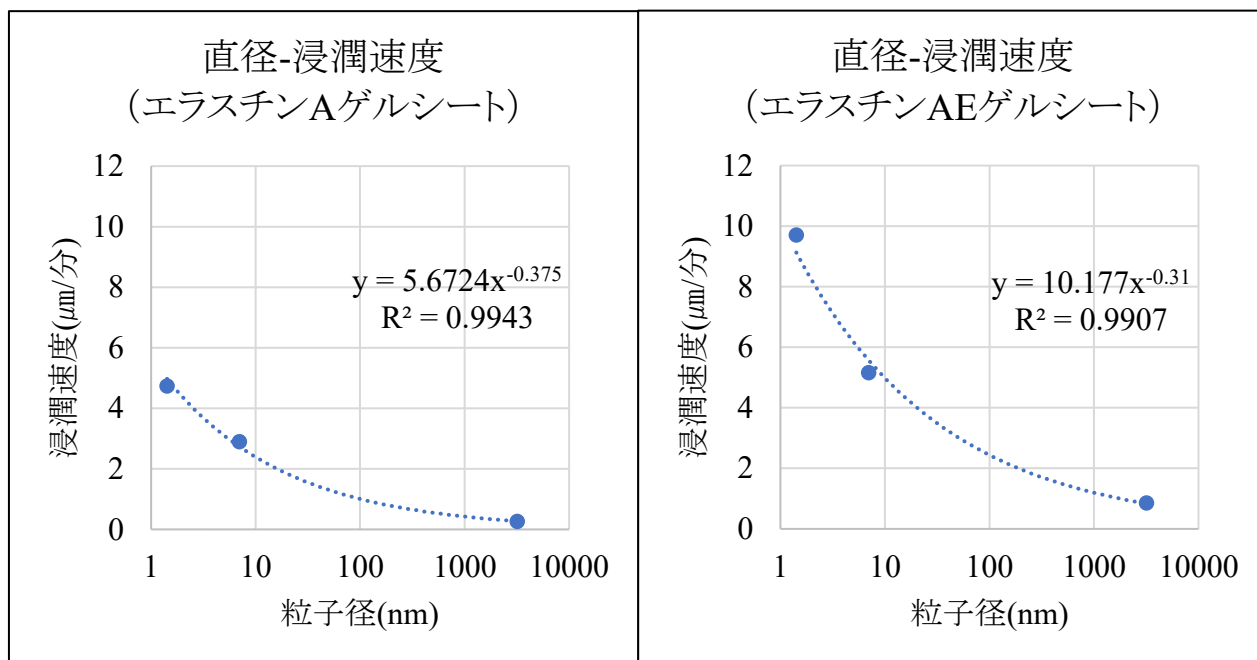


Fig. 4-1 粒子径に対する浸潤速度

様々な粒子径を持つ物質の浸潤速度の予測が可能になったと示唆された。

これらの結果より、エラスチン AE 混合ゲル足場は、培地を循環可能な足場材料として応用できる可能性があることが示唆される。また、異なる色素間での浸潤の違いから、特定の物質は流路や空孔にだけ流れるという局所的な留置を可能にすると考えられる。毛細血管様構造の模倣の視点から評価すると、培地成分・血液中の物質・細胞の3種類の選択的な流入のための空隙サイズが重要となる。

今回の Acid Red 18 を培地成分、ヘモグロビンを血液中の物質、顔料を細胞サイズと仮定すると、顔料の浸潤が極端に遅かったことから、細胞はエラスチン AE ゲルの空孔に優先的に入ることが予想される。

以上より、この 3 次元足場材料は、細胞培養に必要な物質を、足場の細孔を介して供給でき、さらに毛細血管の再生を誘導する血管内皮細胞や、再生したい生体組織を構成する種々の細胞の足場内への導入が期待できる。

また、拡散による酸素の浸透が 200 μm 以内に限られている³⁾ことから、Fig. 3-3～3-8 のグラフについて、浸潤距離が 200 μm までのデータを用いて、近似線を引き、傾き(浸潤速度)を求めた。以下に例を示す(Fig. 4-2)。このグラフにおいては、10.4 $\mu\text{m}/\text{分}$ となり、これを初速度とした。ここでは、Fig. 3-3～3-8 の速度を定常速度と示す。

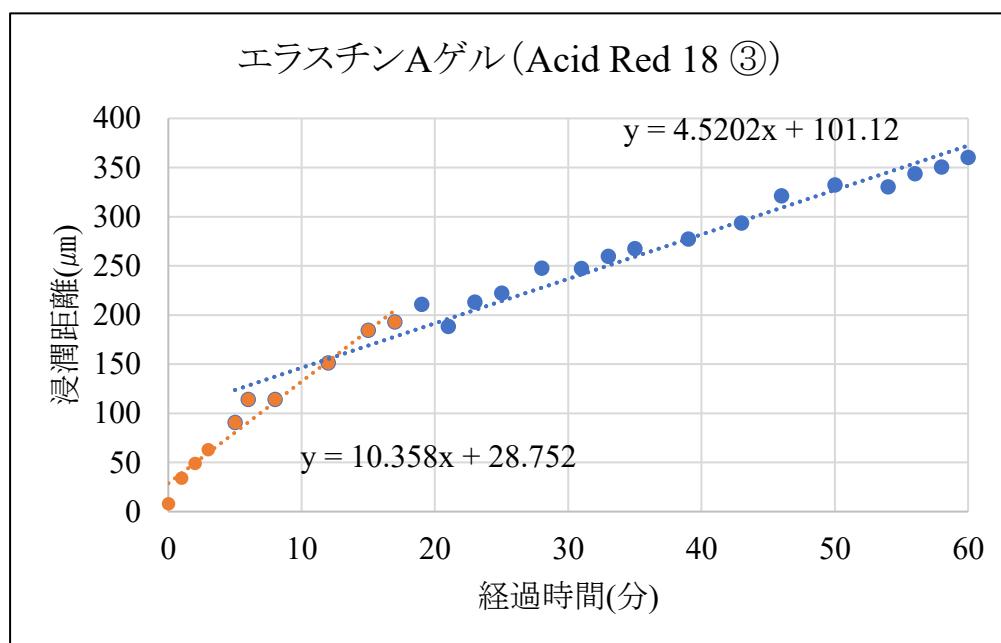


Fig. 4-2 エラスチンゲルシートへの色素浸潤の測定例

初速度と Fig. 3-9 の定常速度を並べて、棒グラフで比較する (Fig. 4-3)。

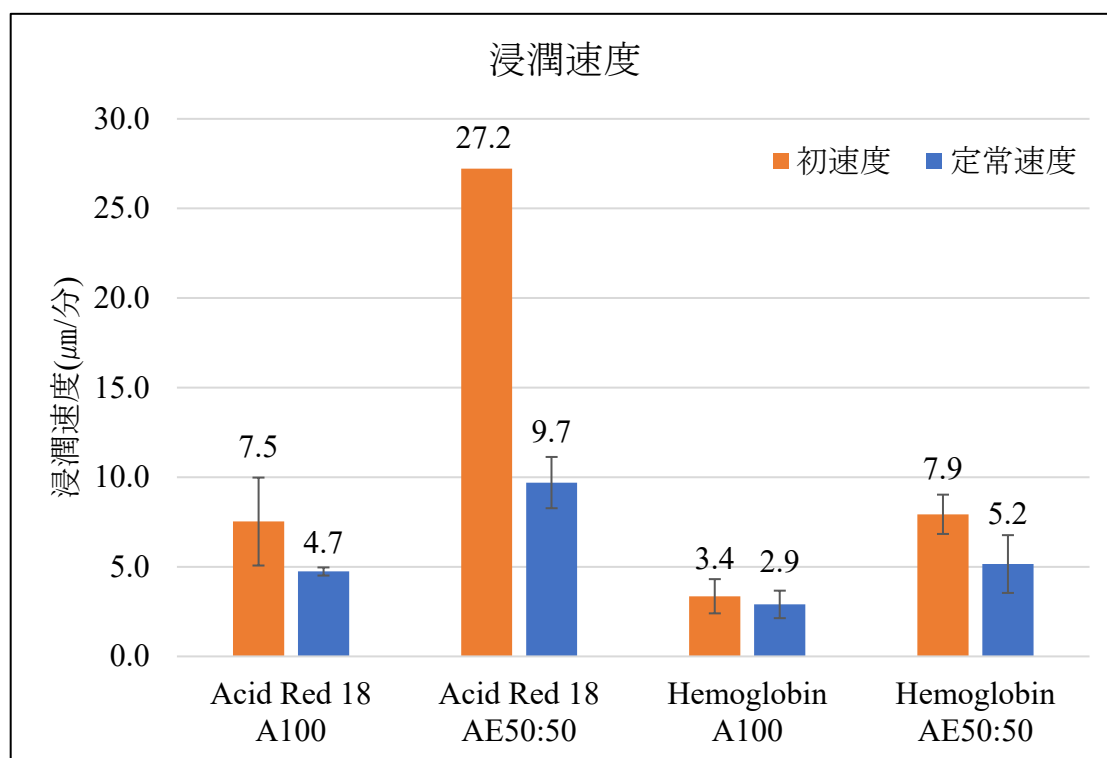


Fig. 4-3 粒子径に対する浸潤速度

まず、各条件における初速度を示す。

Acid Red 18 について、エラスチン A ゲルシートでは $7.5 \pm 2.5 \mu\text{m}/\text{分}$ 、AE ゲルシートでは $27.2 \mu\text{m}/\text{分}$ となり、AE ゲルシートの方が浸潤速度が大きかった。

Hemoglobin についても、エラスチン A ゲルシートでは $3.4 \pm 1.0 \mu\text{m}/\text{分}$ 、AE ゲルシートでは $7.9 \pm 1.1 \mu\text{m}/\text{分}$ となり、AE ゲルシートの方が浸潤速度が大きかった。

さらに、定常速度に対する初速度の大きさを比較したとき、Acid Red 18 について、エラスチン A ゲルシートでは 1.6 倍、AE ゲルシートでは 2.8 倍、Hemoglobin について、エラスチン A ゲルシートでは 1.2 倍、AE ゲルシートでは 1.5 倍であった。

つまり、どの条件においても、初速度の方が大きかった。

そこで、定常速度に対して、初速度が大きくなった原理について考察する。

まず、エラスチンゲル内の流路に導入される色素粒子の量・濃度・圧力を一定と仮定する。

始めは、流路内の色素は同心円状に拡散していくと考えられる (Fig. 4-4A)。このとき、ゲルから出てすぐの部分と、少し進んだ部分では、ゲルから出てすぐの部分の方が触れる面積が小さいことが考えられる。色素粒子の量が一定のため、面積が小さいとより

遠くまで到達すると考える。しかし、拡散半径がゲルシートの厚さである $400\mu\text{m}$ を超えると、上下への浸潤がなくなり、横方向へのみの浸潤となるので、触れる面積が一定となり、速度が一定となったと考えられる。

そのため初速度の方が大きくなり、その後、速度が一定の定常速度となったと考える。

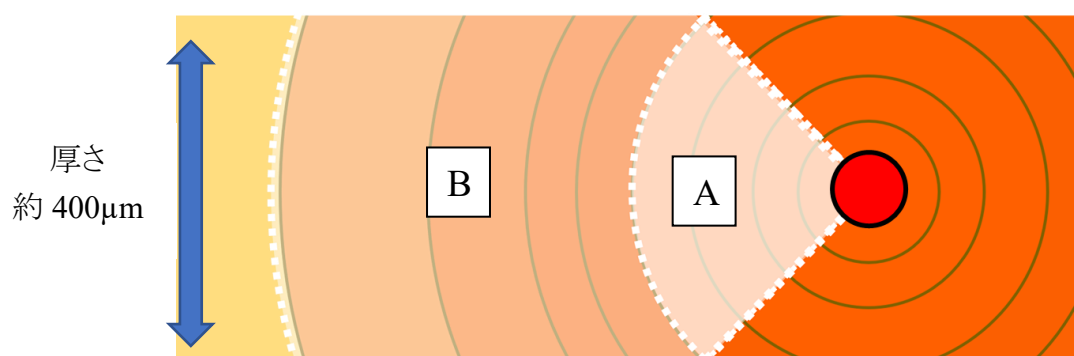


Fig. 4-4 ゲルへの色素浸潤の断面模式図(赤丸:流路の断面)
(A)初期浸潤、(B)定常時浸潤

4-2 架橋糸の直径について(理論値との比較)

3-2-2 における光架橋後の糸の直径の妥当性について考察する。

1 本の PVA 糸の直径は、 $25.6\text{ }\mu\text{m}$ と測定されており、その糸の断面を半径 $12.8\text{ }\mu\text{m}$ の円と仮定した。このとき、各本数での直径の理論値は、円の大枠の中に、半径 $12.8\text{ }\mu\text{m}$ の円を最密充填で入れた時の直径となる (Fig. 4-5)。

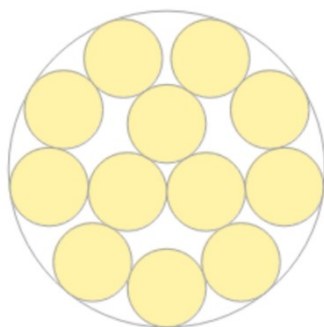


Fig. 4-5 12 本の PVA 糸を最密充填で入れた時の形態

計算知識エンジン (Wolfram Alpha 計算知能) を用いて、「円の中に半径 $12.8\text{ }\mu\text{m}$ の円を X 個詰めた時の入れ物の半径」を計算した。糸の本数と直径の関係が以下のように示された (Fig. 4-6)。

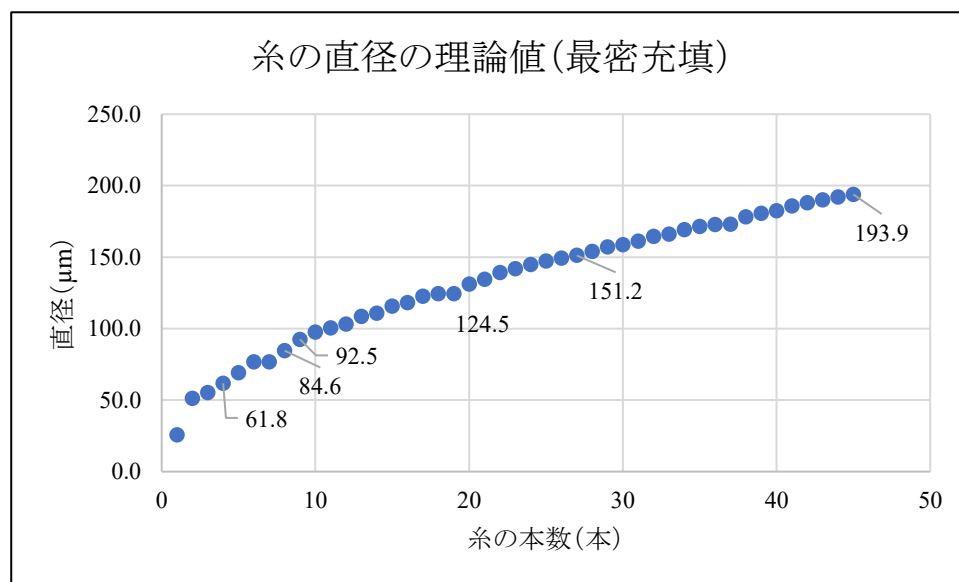


Fig. 4-6 糸の直径の理論値(最密充填)
(グラフ内数値: 本研究で作製した本数の時の理論直径)

Fig. 4-6 を光架橋時と蒸気融合時の糸の直径の値とそれぞれ比較する。

Table 4-1 糸の直径の理論値と光架橋時の比較

	4本	8本	9本	18本	27本	45本
理論値 (μm)	61.8	84.6	92.5	124.5	151.2	193.9
光架橋 (μm)	49.1	89.3	81	113.9	133.5	190.6
差 (μm)	12.7	-4.7	11.5	10.6	17.7	3.3

Table 4-2 糸の直径の理論値と蒸気融合時の比較 (—:No data)

	4本	8本	9本	18本	27本	45本
理論値 (μm)	61.8	84.6	92.5	124.5	151.2	193.9
蒸気融合 (μm)	—	—	84.9	158.8	202.7	310.3
差 (μm)	—	—	7.6	-34.3	-51.5	-116.4

理論値と光架橋時の糸の直径の差に注目した時、どの本数においても、糸 1 本 ($25.6 \mu\text{m}$) の直径以上の差が見られなかった。一方で、蒸気融合と比較した場合、9 本の時を除いて、差が大きいことが確認された (Table 4-1,2)。このことから、光架橋の方が糸の変形が少なく、流路の設計のしやすさの点で優れていることが示唆された。

4-3 流速の妥当性

分岐流路に関して、流速の妥当性を流路徑 (ゲル内の穴の直径) と線速度の観点から考察する。

まず Fig. 3-17 を用いて分岐 PVA 系の本数を流路徑に換算した。また流速について、以下の式が成り立つことから、Fig. 3-19 の流速と流路徑から求めた断面積を用いて線速度を算出した。

$$\text{流速 (mL/min)} = \text{断面積 (cm}^2\text{)} \times \text{線速度 (cm/min)}$$

線速度とは、単位時間あたりにその断面積を通過する速度のことである。

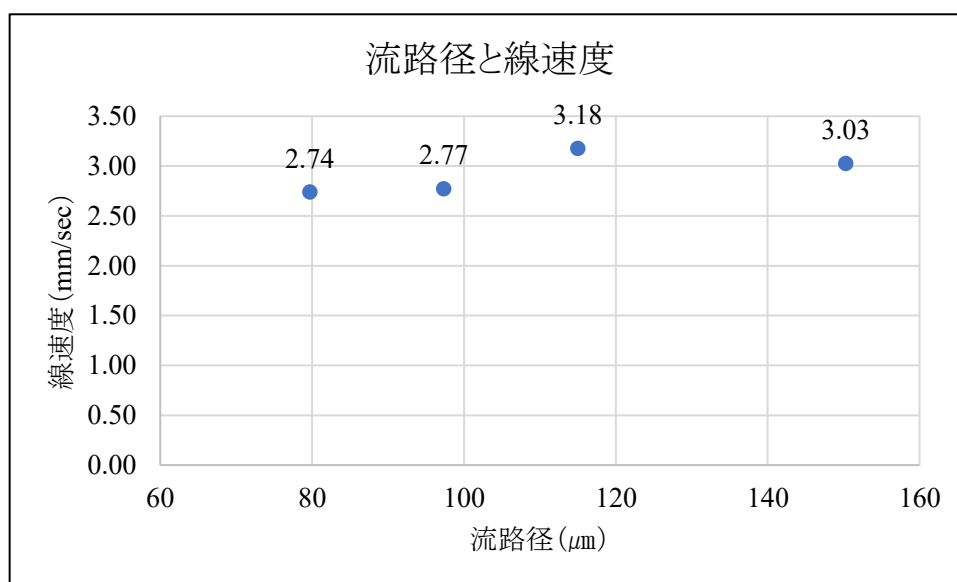


Fig. 4-7 流路徑と線速度

Fig.4-7 より、流路徑が変化するとき、線速度は、2.74, 2.77, 3.18, 3.03 mm/sec とほぼ一定であることが示された。

Fig. 3-17 で示した通り、流路徑に正の相関性がある、つまり分岐時の断面積変化に相関性があることが示唆される。そのため、シリンジポンプにより流入するときの流速を一定に保ったとき、分岐により流速が減少しても、流路徑も減少していること、分岐前と分岐流路の流路徑の和がほぼ等しくなっていることから、線速度が一定になったと考えられる。

実際の生体内では、血管は、大動脈から毛細血管領域へと分岐を繰り返し血管径が小さくなる。このとき、血管径が小さくなると、血管の総断面積が最大に広がり、血流

速度も最小になる²³⁾。つまり、例えば2本に分岐する時に、分岐前の断面積よりも2本の合計断面積の方が大きくなる。そのため、血管径が小さくなっていくと、線速度も小さくなる。この現象を模倣するためには、分岐後の断面積の合計が分岐前よりわずかに大きい流路径にすることが考えられる。そのため、PVA 系を用いた分岐流路の作製において、以上のように制御することで達成できると考える。

今回の Fig. 4-7 においても、流路径が小さい(約 80 μm , 100 μm)とき、線速度が流路径約 110 μm , 150 μm のときに比べ、少し小さくなっていることについては、ゲル内への浸潤により流速がわずかに減ったことによる線速度の減少であると考ええる。

以上より、実際の生体内での挙動模倣の可能性と応用の可能性が示唆された。

4-4 歪み条件下の圧力について

歪み条件下の流速と圧力に関して、Fig. 3-20,21 のグラフの妥当性と応用の観点から考察する。

結果 (Fig. 3-20,21) から、歪み条件下においても、流速は一定に保たれること、圧力が大きくなることが示されている。流速に関しては、一定の速度で色素液を流入させていることから、歪みを加えても流出する量は変わらないはずであるので、妥当であると考えられる。続いて圧力の妥当性について考察する。

今回の圧力は、生体における血圧を想定した。血圧とは太い動脈内の血液の圧力のことである。血圧は心臓の拍動と対応して変化しており、心臓の収縮により高くなった時の血圧を収縮期血圧、心臓が弛緩して低くなったときの血圧を弛緩期血圧と呼ぶ。心臓の拍動に伴う血圧の変化を血圧の心拍変動と呼ぶ。一方、呼吸に伴う血圧の変化を血圧の呼吸変動と呼ぶ。息を吸ったときに血圧は低下し、息を吐いたときに上昇する。血圧が適切な範囲に維持されることにより血液が循環することが出来る。弛緩期血圧 80mmHg、収縮期血圧 120mmHg が標準的な値とされている (Fig. 4-8)²⁴⁾。

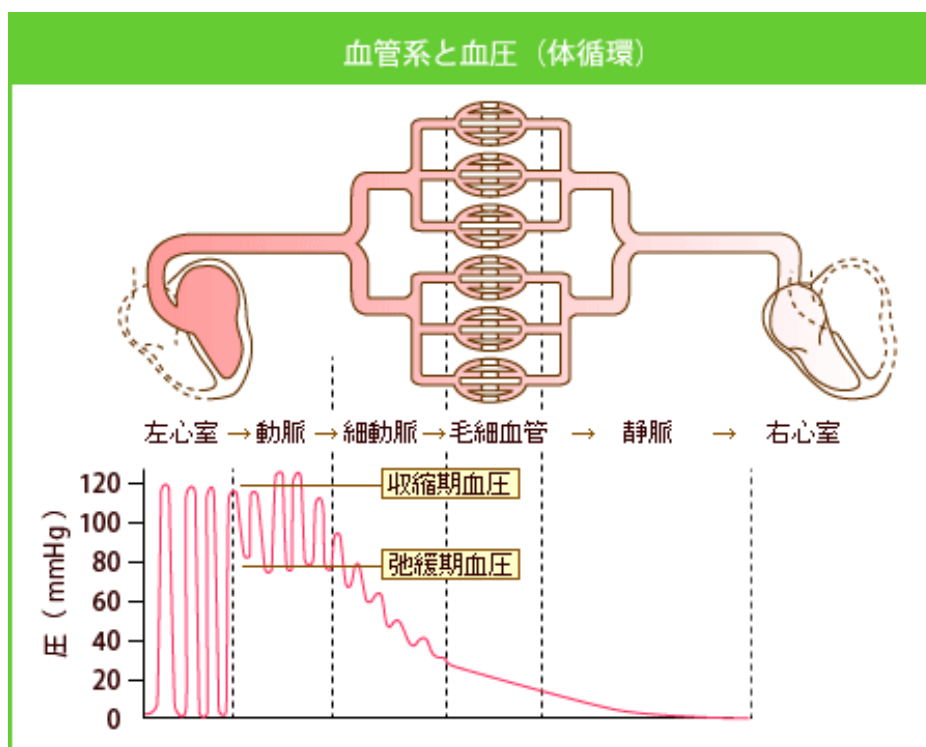


Fig. 4-8 血管系と血圧(体循環)²⁴⁾

血管系各部位における圧が、大動脈から血管が末梢に向かって枝分かれするに従って、低くなっている。本研究において、対象としている血管は、毛細血管と、わずかに血管径が大きくなった細動脈・細静脈である。Fig. 4-8 中のグラフより、細動脈から毛細血管にかけての圧 (mmHg) は、およそ 20mmHg～60mmHg である。

Fig. 3-21 において、ゲルシートの伸長率が 0%の時は 25.6mmHg、7%の時は 58.2mmHg、14%の時は 51.0mmHg という結果であったことについて、以下に生体内の圧を黄色の枠で示した(Fig. 4-9)。

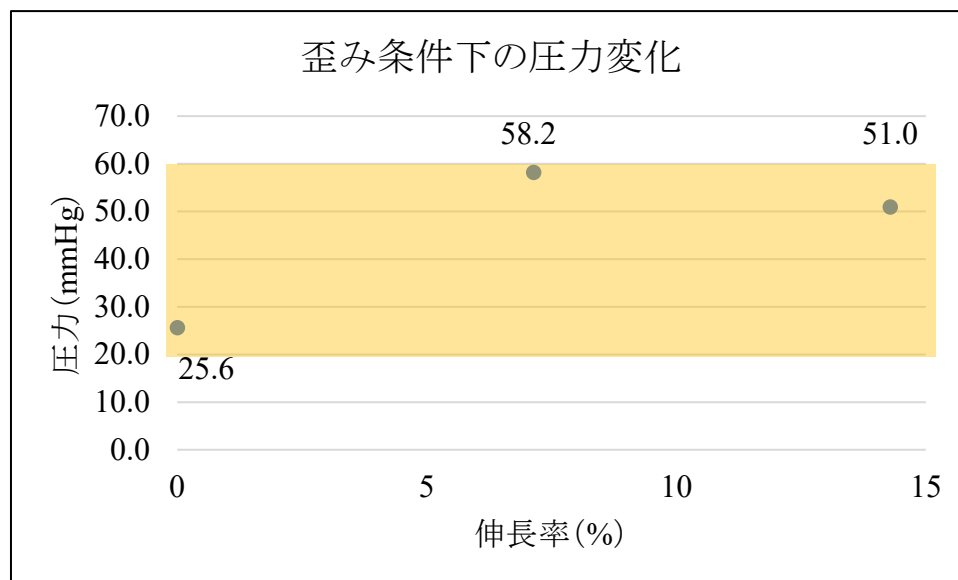


Fig. 4-9 歪み条件下の圧力変化 (Fig. 3-21 改)

つまり、本研究で作製したエラスチンシート内の流路にかかった圧力が生体内の圧と近いことが示唆された。

次に歪み条件下での測定の意義について二点考察する。

まず一点目は、Fig. 4-9 より、歪みにより圧力を変えることができることである。伸長率と圧力の関係に強い相関性があることが示されれば、微小血管においては生体組織での血圧を再現し、模倣することが可能となると考える。

二点目は、歪みによる毛細血管系の収縮弛緩への追従の可能性についてである。

細動脈は径の変化により抵抗血管として機能し血液供給量を調節することが知られている²⁵⁾。径の変化があるということは、細胞が収縮や弛緩をするということで、細胞は足場である細胞外基質と触れていることが考えられる。つまり、微小血管のための足場材料は、伸縮性が必要であると想像できる。そのため、本研究における歪み条件下での測定は、微小血管の収縮弛緩を模倣でき、さらに、細胞導入や移植時には、動きに追従できることが示唆される。

また、ゲルシートの流路内で細胞を培養しながら歪みを与えることで、流路径(血管径)が収縮弛緩するため、収縮時には、流路内の物質が流路外に拡散し、弛緩時には、周囲(培地)から、流路内に栄養の供給がされるというサイクルをつくることのできるのではないかと考える。これにより、*in vitro* において、効率の良い毛細血管網の構築ができると期待する。

4-5 エラスチンゲルシートと細胞に関する推定

エラスチン A 添加培養における先行研究との関連性について考察する。

先行研究 (R1 年度倉田卒業論文²¹⁾) において、エラスチン A を培地に添加すると、血管内皮細胞がエラスチン A の刺激を受けて、通常培養と比べて、毛細血管の周囲に存在する細胞外マトリックスの遺伝子発現や毛細血管様構造の割合に差が生まれることがわかった。

そこで、先行研究と本研究との関連性について考察する。

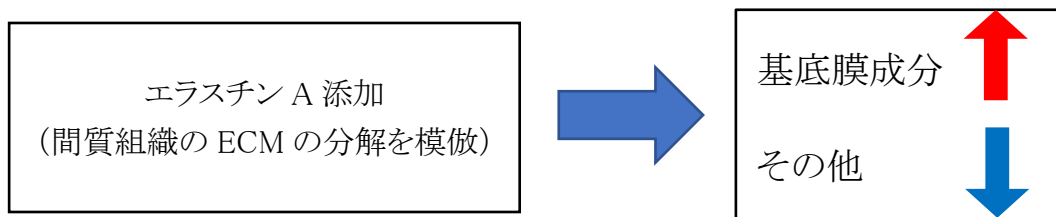
まず、遺伝子発現評価²¹⁾の結果より、エラスチン A を添加すると、Collagen I に対する Collagen IV (毛細血管を構成する基底膜の成分) の割合が増加していたことについて考察する。

始めに血管新生の機序について説明する³⁰⁾。

- 1) 種々の刺激により、FGF や VEGF などの血管新生因子 (サイトカイン) が放出される。
- 2) 血管新生因子により血管内皮細胞からタンパク質分解酵素が分泌されて、血管内皮細胞の下基底膜が分解される。
- 3) 破壊された基底膜間隙から、内皮細胞の遊走や増殖が始まる。
- 4) 遊走した血管内皮細胞が管腔を形成し、基底膜構成成分を分泌し管腔の外に基底膜を形成する。
- 5) 基底膜に沿って周皮細胞が遊走し血管壁の構築ができる。
- 6) 近接の新生血管の吻合が生じ新たな血管網が形成される。

エラスチン A を添加することによって、血管内皮細胞が基底膜を分解した後に遊走のため間質のエラスチン線維を分解するという血管新生の初期 (2 から 3 へのプロセス) を再現したと考えられる。

全 RNA 量が変化しないとした場合、エラスチン A の添加によって、血管新生の途中段階であると血管内皮細胞が認識し、基底膜成分 (Collagen IV、ラミニン) など、血管新生に関与する遺伝子発現が増加し、それ以外が減少傾向にあったと考えることができる。ただ、Collagen IV の発現は変わらなかったことから、ほかの基底膜成分であるラミニンなどの発現が上昇したと予想する。



また、毛細血管様構造の増加についても、先述の Collagen I と Collagen IV のバランスの変化が、管腔形成後の毛細血管の安定性に影響を与え、毛細血管様構造の面積に差が生まれたと考えられる。

本研究で用いた材料は、エラスチン A ゲル、エラスチン AE ゲルをシート状に加工したものである。特に、エラスチン AE ゲルシートは、エラスチン A とエラスチン E を混合させてゲル化させた後、ゲル化しないエラスチン E の部分のみを溶解出させるという方法を用いている。そのため、エラスチン E が溶解出した後に細胞を播種すると、エラスチン A に接することが考えられる。

そのため、今回作製した足場材料は、遺伝子発現調査から示唆された、毛細血管にとって都合の良い環境に寄せることができると考えた。

さらに、あらかじめ微小流路を作製してあること・エラスチン AE ゲルの貫通孔があること、この2点が、酸素・栄養の浸潤、細胞の遊走を活性化させ、より効率の良い毛細血管構造の構築に役立つと考えられる。

最後に今回作製した材料の応用に関して考察する。

本研究において、流路付のエラスチン A およびエラスチン E を混合したシート状エラスチンゲル足場の作製により、毛細血管の最も重要な役割とされる物質交換に優れた材料を得ることができた。このゲル内の流路に関しても、PVA 糸を用いることで、今回作製した分岐をはじめ、目的臓器の血管構造を模倣するなど自在に設計できると考える。さらに、ゲルの厚さはシリコンシートの厚さを変えるだけで変更可能であり、ゲルの混合比率の変更により構造制御ができ、細胞の分布を制御できるという可能性も示唆される。また、歪み条件下において、生体内の流速制御や圧力制御可能性も示唆された。

将来的には、以上の特性を持つ材料を用いることで、組織工学による大型臓器の作製に貢献できると考える。例えば、心臓、腎臓、肺、脳などにおける炎症・損傷部位の治療のために毛細血管シートとして、人工臓器に組み込むことを予想している。このとき、エラスチンシートの特性である伸縮性により、どのような人工臓器であっても対応できることを期待している。

5 結論

本研究により、次のことが明らかになった。

①エラスチン A およびエラスチン E を混合したシート状エラスチンゲル足場の作製、および流路付のエラスチン足場の作製に成功した。

②各エラスチンの混合割合を変えることで、ゲル内の細孔サイズを変えることが可能になり、毛細血管様構造としてゲル内における物質交換を物質のサイズ選択的に制御可能であることを明らかにした。

③流路の直径と流量の相関性から、流量の制御が可能であることが示唆され、さらに歪み条件下において、生体の毛細血管系の圧力を再現することができた。

よって、毛細血管様構造を持つ再生医療用エラスチン足場の開発に成功した。

6 謝辞

本研究および修士論文を作製するにあたり、丁寧なご指導を賜りました、三重大学工学研究科 分子素材工学専攻 生体材料科学研究室 宮本 啓一教授、並びに晝河 政希助教に深く御礼申し上げます。

宮本先生には、多大なご迷惑をおかけしたのにもかかわらず、優しく寄り添って、時には厳しく、様々な助言をいただきありがとうございました。また、研究で用いる実験装置や材料を数多く作製いただき、あらゆる面で非常にお世話になりました。血管というテーマを、先生の下で研究を行えて良かったと感じております。

晝河先生には、研究室生活において様々な場面で指導いただき、お世話になりました。

また、社会における医療の重要性、人工臓器の興味深さを教えてくださり、医用工学の分野へ進むきっかけをくださった堀内孝名誉教授に感謝申し上げます。

また、副査を担当いただきました湊元幹太教授に深く御礼申し上げます。

事務員の村上節子様には、研究室生活を様々な面からサポートしていただき、ありがとうございました。村上さんとお話ししているときは、心から落ち着ける大切な時間でした。

本研究を進めるにあたり、研究の事から日常生活において様々な面でご助力いただいた諸先輩方、様々な場面でサポートしていただいた後輩たちに感謝します。同じ血管を扱うテーマの先輩であった金澤さん、濱口さんには、実験手技や研究の取り組み方を学ばせていただいただけでなく、多くの優しさも教えていただき、心から感謝しています。また、後輩の尾崎君には、私の拙い指導も真剣に聞いて実践してくれて、感謝しています。さらに、同じエラスチンググループとして、実験のアドバイスや議論をしてくれた、澤野君、松尾君、原君にも感謝の気持ちでいっぱいです。そして、3 年間、共に学び、様々な場面で活動を共にした同期の豊田真由さん、長瀬周平君、長谷美里さん、吉村尚親君に深く感謝いたします。皆さんに何度も相談に乗ってもらったり、励まし合ったりできたことが、私の原動力でした。本当にありがとう。

最後に、この 6 年間の大学生活、生まれてからの 24 年間、体力的にも精神的にも苦しかったとき、いつも優しく見守ってくれた家族には、心から感謝しております。来年から社会人として、この研究室で学んだ事も糧に、より一層精進していきます。

令和 4 年 倉田園加

7 参考文献

- 1) 一般社団法人日本人工臓器学会; “再生医療について”
<https://www.jsao.org/public/faq/faq04/> (accessed 2022-2-8)
- 2) National Institute of biomedical Imaging and Bioengineering; “Tissue Engineering and Regenerative Medicine”
<https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/tissue-engineering-and-regenerative-medicine> (accessed 2022-2-8)
- 3) Yuan Liu, *et al.*; In Vitro Construction of Scaffold-Free Bilayered Tissue-Engineered Skin Containing Capillary Networks, Biomed Res Int. 2013
- 4) 杉山循環器クリニック; “心臓と循環について”
<https://sugiyama-junkanki.com/index.cgi?page=heart> (accessed 2022-2-8)
- 5) 千葉大学フロンティア医工学センター 羽石研究室; “微小循環のイメージングと解析”
<http://www.cfme.chiba-u.jp/~haneishi/research/Now/microcirculation/index.html>
(accessed 2022-2-8)
- 6) 山田真澄, 「流れを自在に操る」マイクロ流路細胞培養系, 生物工学会誌 第99巻 第7号 360-363. 2021
- 7) 川上浩良, 人工臓器用膜材料; 人工臓器 35 巻 1 号 2006 年
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsao1972/35/1/35_1_189/_pdf
- 8) BC campus; ANATOMY AND PHYSIOLOGY, Chapter 20. The Cardiovascular System: Blood Vessels and Circulation, 131 20.1 STRUCTURE AND FUNCTION OF BLOOD VESSELS
- 9) 特定非営利活動法人 血管医学研究推進機構; 入門 血管新生学, (2013)
- 10) 児玉龍彦 他; 血管生物学, (1997)
- 11) 高倉 伸幸, 一般社団法人日本血栓止血学会; “血管新生”
https://www.jsth.org/glossary_detail/?id=26 (accessed 2022-2-8)
- 12) Hiroyasu Kidoya, *et al.*; Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis, The EMBO Journal (2008) 27:522-534
- 13) 日本血管生物医学会; 血管生物医学事典, (2011)
- 14) コスモバイオ株式会社, <https://www.cosmobio.co.jp> (accessed 2022-2-8)
- 15) 資生堂コラーゲン LABO
<https://www.shiseido.co.jp/collagenlabo/know/about/> (accessed 2022-2-22)
- 16) 平金産業株式会社, “コラーゲンについて” (accessed 2022-2-8)
- 17) 株式会社ニッピ°, “コラーゲン製品”
<https://www.nippi-inc.co.jp/product/chemistry/tabid/114/Default.aspx> (accessed 2022-2-8)

2022-2-8)

- 18) Mao Mao, et al.; Type IV Collagens and Basement Membrane Diseases: Cell Biology and Pathogenic Mechanisms, Current Topics in Membranes, Academic Press, Volume 76, Pages 61-116, 2015
- 19) 伊藤 悠貴: Epigallocatechin gallate 複合化による再生医療用エラスチン足場材料の分解制御方法の開発/令和元年度修士論文(2019)
- 20) 井上 綱太: 弾性線維再生用基材としての Elastin-Fibrillin Hybrid Gel の開発/平成 29 年度修士論文(2017)
- 21) 倉田 園加: エラスチンを用いた毛細血管形成法に関する研究/令和元年度卒業論文(2019)
- 22) 今村 道博, 細胞外マトリックスと血管新生, 日薬理誌 (Folia Pharmacol. Jpn.) 107, 153~160 (1996)
- 23) 株式会社ニチビ;
<https://www.nitivity.co.jp/products/solvron/> (accessed 2022-2-8)
- 24) ChemicalBook
https://www.chemicalbook.com/Price_JP/Acid-Red-18.htm (accessed 2022-2-9)
- 25) Alexandro M.M.Vargas *et al*, Kinetic and equilibrium studies: Adsorption of food dyes Acid Yellow 6, Acid Yellow 23, and Acid Red 18 on activated carbon from flamboyant pods, Chemical Engineering Journal, Volumes 181–182, 1 February 2012, Pages 243-250
- 26) 奈良県立医科大学 医学部 化学教室 酒井研究室 ホームページ
https://www.naramed-u.ac.jp/~chem/invest_blood.html (accessed 2022-2-9)
- 27) 「循環器系」ユニット講義録11, 12
<https://www.lab2.toho-u.ac.jp/med/physi1/cardio/cardio11,12/cardio11,12.html>
(accessed 2022-2-9)
- 28) 東邦大学 薬学部薬物学教室 田中光 行方衣由紀 濱口正悟, 「循環系と血圧」
<https://www.mnc.toho-u.ac.jp/v-lab/shinkin/circulatory/circl-1-1.html> (accessed 2022-2-9)
- 29) 筒井達夫; 「ヒトの循環系と血液ポンプ」ターボ機械第 22 巻 第 1 号(1993)
- 30) 安光英太郎 他、細胞外マトリックスと血管新生, Tiss.Cult.Res.Comm.16:123-127.1997