

水溶性エラスチンの凝集特性とマトリックス形成

平成 18 年 度

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

柴 田 昌 和

平成 18 年度 修士論文

水溶性エラスチンの凝集特性とマトリックス形成

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

柴田 昌和



目次

1 章 緒言

1-1 再生医療と組織工学	1
1-2 細胞外マトリックス	3
1-3 エラスチン	4
1-4 現在までの研究	7
1-5 本研究の目的	9

2 章 水溶性エラスチンの調整

目的	10
2-1 ブタ血管からの不溶性エラスチン抽出	10
2-2 不溶性エラスチンの可溶化	13
2-3 水溶性エラスチンの分類	15
2-3-1 凝集温度による分類	15
2-3-2 ゲル強度による分類	18
2-4 水溶性エラスチンの性質(タイプ A~E)	24
2-4-1 凝集温度	24
2-4-2 ゲル強度	27
2-4-3 分子量分布	30
2-5 考察	33

3 章 凝集温度と相互作用

目的	34
3-1 添加物による凝集温度の変化	35
3-1-1 イオンの影響	35
3-1-2 pH の影響	43
3-1-3 疎水性相互作用の影響	46
3-1-4 糖の影響	50
3-1-5 架橋剤の影響	55
3-2 考察	58

4 章 エラスチンマトリックス

目的	59
4-1 方法	60
4-1-1 エラスチンハイドロゲルの作成	60

4-1-2 弾性率及び伸張率の測定	6 2
4-2 添加物による変化	6 3
4-2-1 架橋剤の影響	6 3
4-2-2 イオンの影響	6 6
4-2-3 疎水性相互作用の影響	6 9
4-2-4 pH の影響	7 2
5 章 結論	7 5
参考文献	7 6

1 章. 緒言

1-1 再生医療と組織工学

人体はその臓器や組織が損傷を負った場合、ある程度は自己で修復する機能が備わっている。しかし事故や病気などで、大きく欠損したり、著しく機能がそこなわれたりすると、自己修復が困難になる。そこで現在、それらの損傷や疾患に対しては、臓器移植又は人工臓器による治療が主に行われている。しかし、臓器移植には、常に拒絶反応、免疫抑制の医学的問題と深刻なドナー不足という社会的問題を抱えており人工臓器も一部を除いては、生体のリズムに連動して機能するような複雑な組織には適応できていない。これらの諸問題の解決策として、細胞を積極的に利用しその機能の再生を図る、「再生医療」の実現が強く求められている。

「再生医療」は、細胞を活用することによって、自己組織の再生修復あるいは臓器機能の代替を行う治療の試みである。また再生医療の3つの重要な要素として、「細胞」・「増殖因子」・「細胞足場材料」があげられる。近年の再生現象に係わる細胞の生物医学研究の進歩はめざましく、増殖分化ポテンシャルの高い幹細胞の存在が明らかにされている。しかしながら、これらの細胞を単に用いるだけでは生体組織の再生を誘導できる訳ではない。生体中で細胞が単独で生存、機能していることは極めて稀で、細胞はその周辺環境と相互作用しながら、はじめてその生物機能が発揮できる。すなわち、細胞を利用した生体組織の再生誘導には、細胞が増殖・分化するための適当な環境を与えることが不可欠であり、この再生誘導の細胞の環境を構築する技術を組織工学(Tissue Engineering)と呼ぶ。

生体内環境の構築を担っているのは、細胞外マトリックス(ECM: extra cellular matrix)と呼ばれる物質群である。細胞外マトリックスはタンパク質や糖類からなり、その主な構成成分に、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカンなどがある。細胞外マトリックスは細胞の間を満たし、細胞がばらばらになることを防ぎ、細胞の形態や機能を決定する役割を担っている。

現在、組織工学の研究のために人工細胞外マトリックスの開発が多く試みられているが、人工材料を生体に導入する際は、生体適合性が大きな問題になり、これには主に非毒性、界面適合性、力学適合性などが含まれる。界面適合性とは、材料の表面特性が生体に対して、非刺激性、組織結合性、非異物性であるかどうかの適合性である。これに対して力学的適合性は、材料の弾性率や剛性のような機械的性質及び、材料の形状といった力学的特性に対する適合性である。特に力学的適合性が要求されるのは、人工血管、人工神経、人工筋、人工関節等の生体弾性組織に強く結合した状態で用いられる材料である。現在行われている、人工材料を用いた人工細胞外マト

リックスの一例として、ポリ4フッ化エチレン(PTFE)やポリエチレンテレフタレート(PET)繊維から成る布を、筒状に加工し、コラーゲンをコーティングした人工血管がある。しかし、こうした材料では、生体の血管と力学的に不適合であるため、異物反応を誘発し、結果として結合部位や人工血管内壁に血栓が形成されやすく、血管の閉塞を誘発することが指摘されている。また、置換部位に力学的ストレスが発生することで、周辺細胞にも影響を与え、異常増殖等の原因にもなってしまう。このような問題を解決するためには生体との力学的適合性が必要である。しかし、特に弾性組織のような生体組織と、既存の生体材料の弾性率特性(表 1-1-1)には大きな開きがある。このような生体組織と人工材料の力学的適合性の一致が、組織工学材料における重要な問題としてある。

表 1-1-1 生体組織と人工材料の弾性率

生体組織	弾性率(Pa)
歯(エナメル質)	8×10^{10}
骨(圧縮)	0.8×10^{10}
腱(引っ張り)	1×10^8
動脈血管(横方向 引っ張り)	2×10^6
筋肉(引っ張り)	3×10^5
人工材料	
アルミナ	4×10^{11}
鉄	2×10^{11}
アパタイト	8×10^{10}
バイオガラス	8×10^{10}
ポリ L-乳酸(PLLA)	1×10^{10}
シリコン	1×10^9
コラーゲンゲル	1.5×10^1

1-2 細胞外マトリックス(ECM:extra cellular matrix)

生体組織は、様々な細胞が秩序だって集合し、3 次元的に構築されているが、それは細胞だけが寄り集まって形作られている訳ではなく、細胞の他に細胞自身が作り出した ECM と共に存在している。そのため細胞は、バラバラになることもなく、引っ張りや圧縮などの外圧に対して抵抗する強度を持つことができる。

また ECM はそれら機能的組織の物理的構築(例:軟骨や骨)や、細胞接着による細胞の足場提供、細胞増殖因子などの保持や提供、(例:ヘパラン硫酸に結合する細胞増殖因子 FGF)、細胞増殖、細胞分化、細胞移動など多種多様な役割、細胞の制御を担っている。ECM は、主にコラーゲンやエラスチンといった繊維性の蛋白質、プロテオグリカンやグリコサミノグリカンといった糖、そしてフィブロネクチンやラミニン等といった接着蛋白質から成っている。

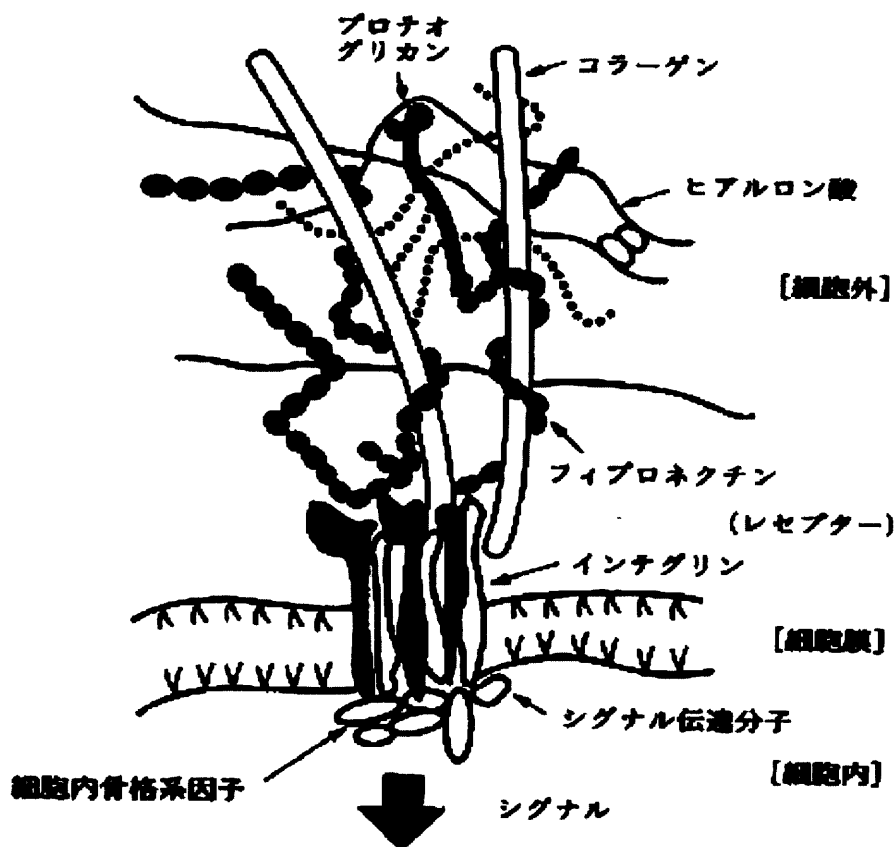


図1-2-1 細胞外マトリックスと細胞との関わり²⁰⁾

1-3 エラスチン

エラスチンは分子量が約67 KDa の細胞外マトリックスの成分の一つであり、組織から酸、アルカリ、アルコール等で処理後に残る、不溶性タンパク質と定義される。組織の伸縮性、弾性を生み出す繊維状タンパク質で、動脈、靱帯、肺などの高い伸縮性を必要とする組織に多く発現している。(図1-3-1)

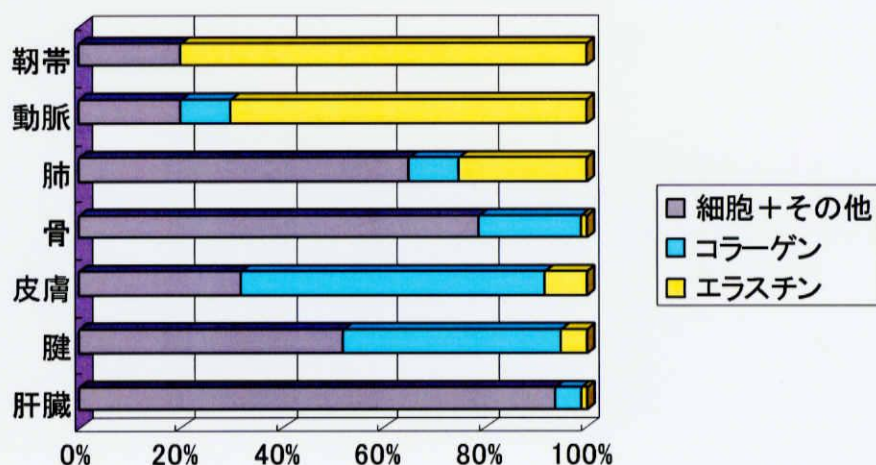


図1-3-1 各生体組織における、エラスチン、コラーゲン、細胞その他の組成比

エラスチンは、一次構造に疎水性側鎖を含むアミノ酸が約92%を占めており、エラスチン凝集体の収縮・弛緩により、立体構造が容易に復元する。また、生体内において以下のような架橋構造を形成することで、その弾性・不溶性・熱安定性を有している。エラスチンは前駆体タンパク質である水溶性のトロポエラスチンとして生合成され、疎水性側鎖の影響による分子間(内)疎水性相互作用によって凝集し、さらにそれが進むことによってコアセルベーションと呼ばれる液-液間二層分離現象を起こした後、トロポエラスチンに含まれるリシン側鎖に銅イオンとリシルオキシターゼがともに働き、生体内架橋反応(図1-3-2)を経て不溶性エラスチンとして形成される。架橋構造は、トロポエラスチン中の4つのリシン側鎖から導かれた4級ピリジニウム環を含むデスモシン、インデスモシンと呼ばれる特徴的なもので、複数のポリペプチド鎖を形成し、弾性に富んでいる。(図1-3-3, 1-3-4)またこのような弾性の発現には架橋の前段階で、分子間の相互作用から構造決定に関与する、凝集、コアセルベーションが重要な因子であると考

えられている。例えば、大動脈弁上狭窄症 (SVAS)は、トロポエラスチンの遺伝子異常が、エラスチン沈着不足を引き起こし、血管の弾性率が低下し、閉塞性病変をともなう心不全などがおこる病気だが、この遺伝子異常があるトロポエラスチンはコアセルベーション能力に異常があると報告されている。

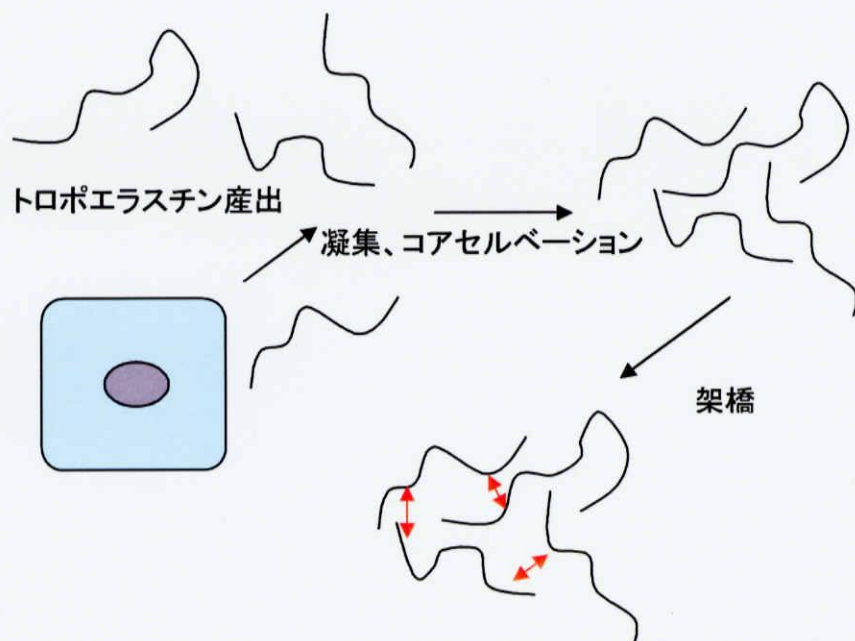


図1-3-2 トロポエラスチンの産出から架橋

Elastinの構造

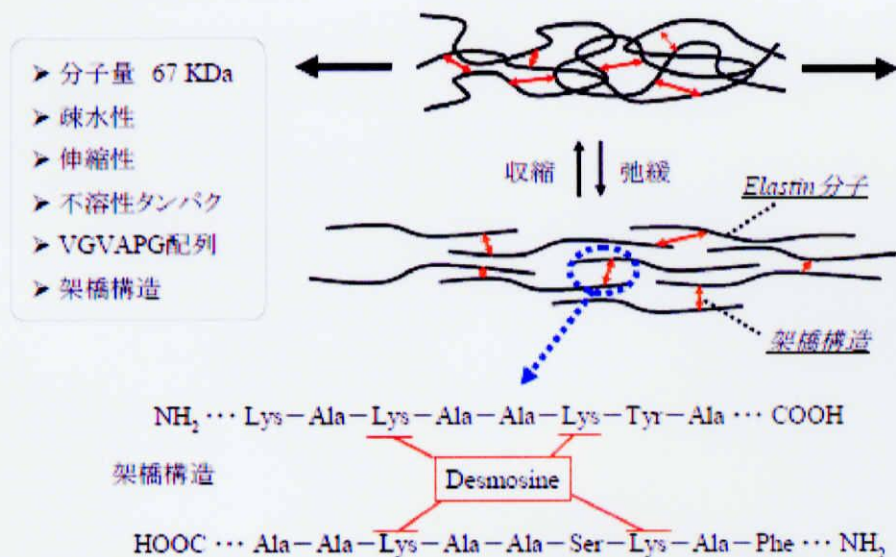


図 1-3-3 エラスチンの構造と架橋構造

<生体内でのエラスチン架橋構造形成機構>

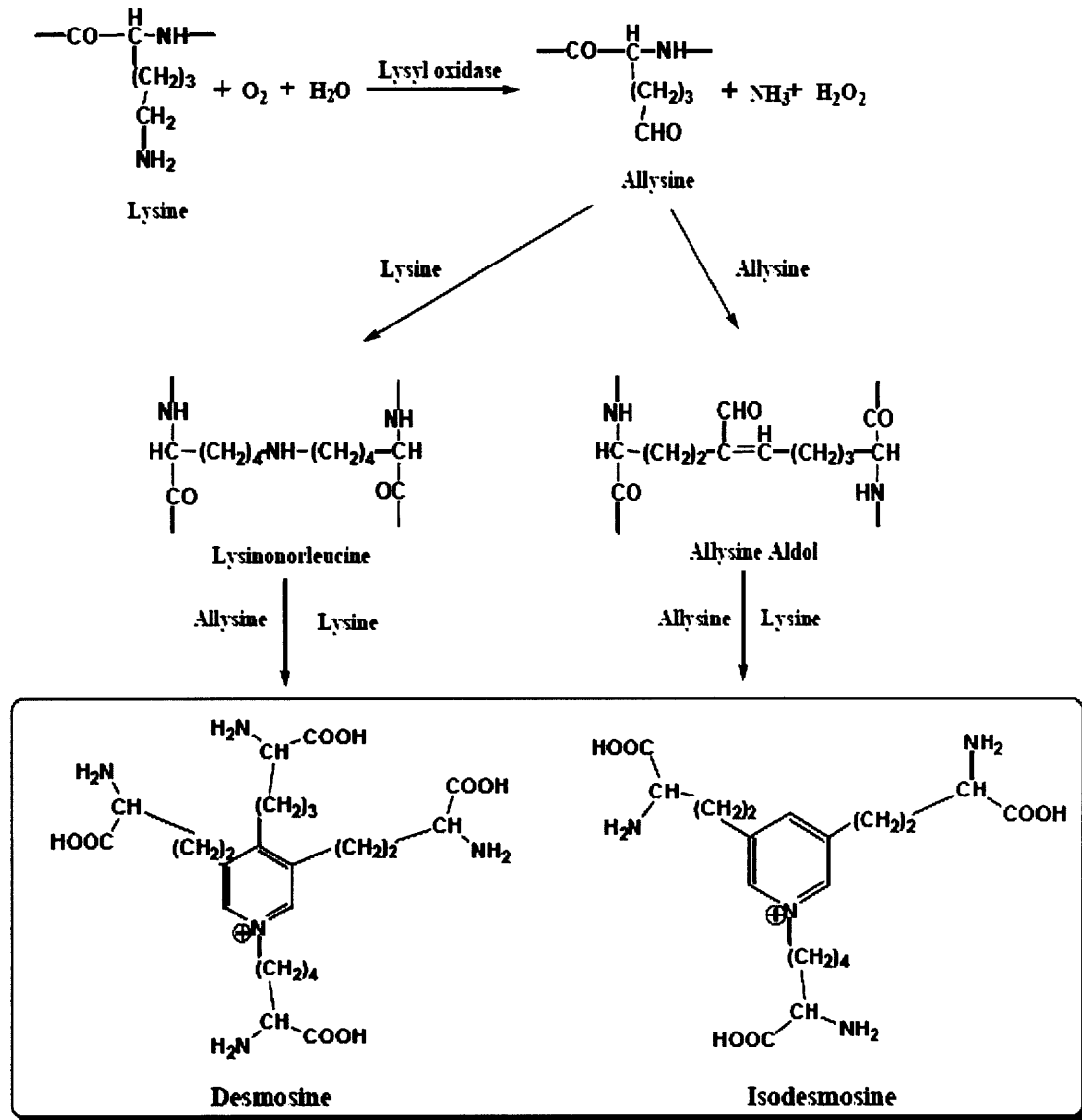
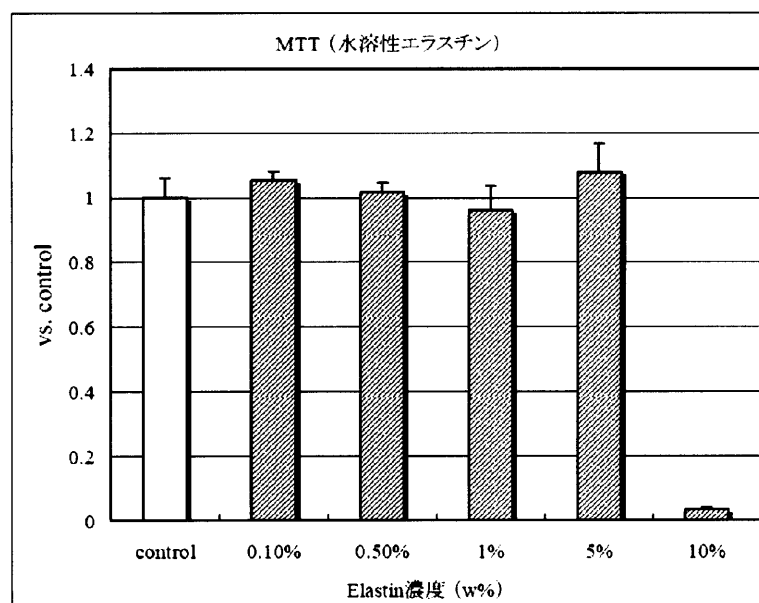


図1-3-4生体内でのDesmosine, Isodesmosine 形成機構²⁶⁾

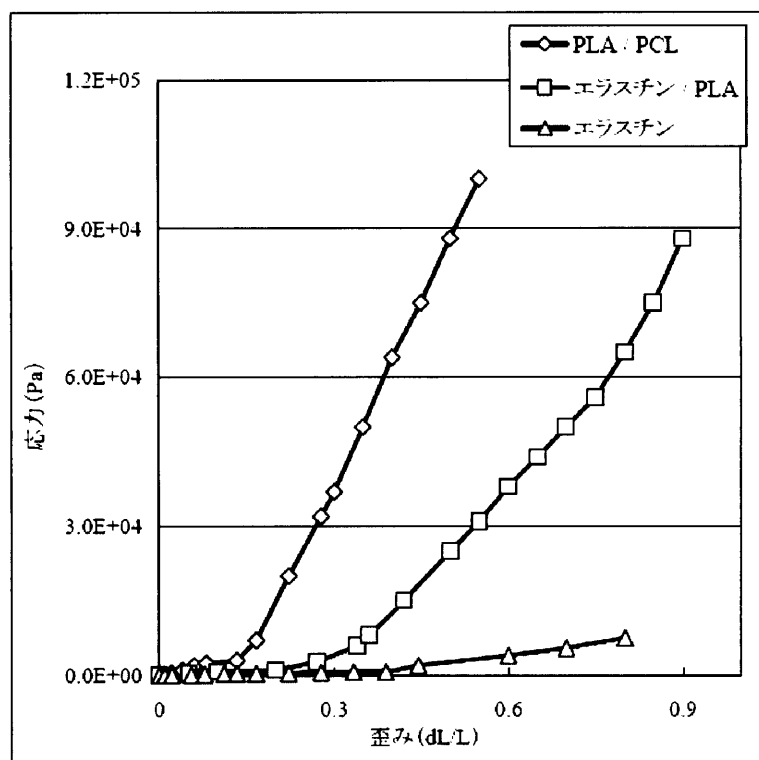
1-4 現在までの研究

組織工学は、現在の医療の質と量を大幅に変えつつある。心臓や弁などの機械的機能は現在の工学的技術、材料で補えつつあるが、小口径人工血管などのように、人工材料の生体適合性が不十分で、異物拒否反応を生じてしまう人工材料もまだ多い。そこで、細胞の持つ生体適合性と機能性をそのままに利用し、人工材料や生体由来材料とを組み合わせたハイブリッド組織体が形成できれば、生体内で許容され自己組織化を獲得できると期待される。我々の研究室では、動脈、靱帯、肺などの弾性組織の細胞外マトリックス中に多く存在し、その伸縮性などの弾性を担うエラスチンに着目し、組織工学材料としての応用開発を進めている。これまでに以下のような成果を得ている。

1. ブタの大動脈から不溶性エラスチンを中性条件処理により抽出し、熱シュウ酸処理法を用いることで、水溶性エラスチンを調整した。この水溶性エラスチンはMTT試験(細胞活性試験)の結果、細胞に対して毒性や失活化などの影響がないことがわかり、材料原料としての安全性が確認できた。(下図中の10%条件は水溶性エラスチン自体が凝集してしまい、正確な測定ができなかったため低下している)



2. 伸縮性構造を形成させるための独自の架橋剤を高純度で合成し、その架橋剤と水溶性エラスチンを用いたエラスチンマトリックスの作成を可能とし、弾性体で伸縮性を有したゲルの作成を可能にした。さらに合成高分子と複合化させることにより、生体血管などの生体組織の力学特性に似た“Jカーブ”の歪み-応力相関を再現した。(下図のエラスチン/PLA)



3. エラスチンをコーティングした細胞培養シャーレで細胞培養を行った結果、血管平滑筋細胞はシャーレ上に接着および伸展したが、線維芽細胞には接着しにくいことがわかり、細胞のエラスチンに対する特異的な足場依存性が確認された。

1-4本研究の目的

エラスチンに着目し、エラスチンを組織工学用材料として開発してきたこれまでの研究の問題点として、以下の点が明らかになっている。

＜水溶性エラスチン試料の規格＞

水溶性エラスチンを作成する場合は、不溶性エラスチンに対してシュウ酸加水分解処理を1時間毎に分けて行い、それぞれに回収していくことで、比較的性質の安定したエラスチンを得ていた。しかし生体由来の材料を用いているために、処理時間毎に分ける方法では、材料としての確実な性質の安定という意味では不完全であった。

＜エラスチンゲルの特性制御、特に伸縮性の制御に関する知見＞

エラスチン用架橋剤と水溶性エラスチンを用いたエラスチンマトリックスの作成は、更に合成高分子と複合化させることで生体組織に近い種々の弾性体を有するゲルの作成を可能にしたが、エラスチンのみの組織工学用材料の力学特性や生体適合素材を得るための方法が不十分であった。特に伸縮性を発現させるための原理や理解が不十分で再現性に欠ける。

そこで今回、様々な生体組織と力学的適合性を持ったエラスチンゲルを作成するために、エラスチンゲルの構造決定に大きく関与している水溶性エラスチンの凝集能と、コアセルベーション能力およびゲルの力学特性の関係を明らかにし、凝集能を制御することによるエラスチンゲルの物理強度の制御を試みることを目的とした。

具体的には以下の主に2点について研究を行った

- 1、生体由来の材料から、より安定したエラスチン試料を得るため、凝集性という観点から、水溶性エラスチンのサンプルの性質を分類し規格化する。
(第2章)
- 2、得られた試料の凝集現象から水溶性エラスチンの分子間相互作用を予測し、伸縮性発現のための、エラスチンマトリックス分子モデルを考案し検証する。
(第3章および第4章)

2 章 水溶性エラスチンの調整

目的

組織工学用生体材料には細胞の足場材料としての成形加工性が必要であるが、エラスチンは生体中ではエラスチン分子間に存在するデスモシン、イソデスモシンと呼ばれる強固な架橋構造の存在によって水に不溶で、加熱や、アルカリ、プロテアーゼに対して強い抵抗性を持ち、極めて成形性に劣る素材であることが知られている。

そこでエラスチンを組織工学用生体材料として用いるために、シュウ酸加熱処理することによって、ブタ血管から抽出したエラスチンを水溶化し、再度専用の架橋剤を利用することで成形体であるゲル材料に加工を可能にしてきた。

一般に、生体抽出物は、生体との高い適合性を得られるなどの利点がある一方、材料としての性質が安定しないという欠点がある。そこで、本実験ではシュウ酸処理で得られる水溶性エラスチンを分類わけし、その物性として凝集温度と、一定条件下でゲルを作成し、その弾性率という観点から水溶性エラスチンを数種類に分類し、性質の安定化および規格化を目指した。

2-1 ブタ血管からの不溶性エラスチン抽出

[試薬・器具・機器]

- ・ポリプロピレン手付きビーカー(5L) (NIKKO)
- ・圧力鍋 (Pearl Plus)
- ・電気バケツ (National)
- ・電気衣類乾燥機 (TOSHIBA)
- ・塩化ナトリウム (Wako)
- ・エタノール (99.5 %) (Wako)

[方法]

- ① 三重県松阪食肉センターより屠畜直後のブタ大動脈血管組織(17.6kg)を水道水で洗浄し、血塊や脂質、余分な組織をハサミで切り取り、さらに、水(10L×5)で洗浄した。(写真 2-1-1)
- ② 5L ポリプロピレン手付きビーカーに 2Kg ずつ分け、それぞれ 2.5L の塩水(10 %)に浸し、冷蔵庫に一日静置(攪拌してもよい)した。
- ③ ハサミを使い、透明に浮き上がった脂肪やコラーゲンを除去した。再びそれぞれ 2.5L の塩水(10 %)に浸し、冷蔵庫内にて一日静置し、残存コラーゲンを除去した。

- ④ その後、冷蔵庫から取り出し、新しい 2.5L の塩水 (10 %) と交換し、再び冷蔵庫内で一日静置した。
- ⑤ 冷蔵庫から取り出し、水道水 (10L×2) で洗浄後、水道水 (2.5 L) に対し、血管 (1.9 kg) を加え圧力鍋で 1 h 煮沸した。圧力鍋より取り出し、水道水 (10L×5) で不純物を洗浄し除去した。
- ⑥ 次にミキサーに入れ (血管 500 g に対し、水道水 500 g)、一片が、5 mm 程度の片になるまでミキサーにかけた。ミキサーから圧力鍋に移し、そこに、水道水 (2.5 L) を加え、圧力鍋で 1 h 加圧加熱した。
- ⑦ 圧力鍋から、メッシュの袋に移し入れ、水道水で浸し洗いをし、沈殿したタンパク質を除去した。その後水を換え、水量 (1 min, 2 L, 24 h) で流し洗いをを行った。
- ⑧ よく水を切ったら、メッシュの袋から電機バケツに移し入れ、蒸留水を加え洗浄 (10 min×4 回) した後に水を切った。(写真 2-1-2)
- ⑨ エタノールを最終濃度 50 %になるように加え、30 分間静置した。少し濃度を上げ、エタノールを最終濃度 70 %になるように加え、90 分間静置した。さらに濃度を上げ、エタノールを最終濃度 90 %になるように加え、1 日静置した。
- ⑩ エタノールを取り除き、電気衣類乾燥機で乾燥させた。(重量 1193 g) (写真 2-1-3)

[結果]

余分な組織を除いたブタ血管(①を行った後)9103g から 1193g の不溶性エラスチンが得られた(収率 13.1%)



写真 2-2-1 ブタ大動脈組織

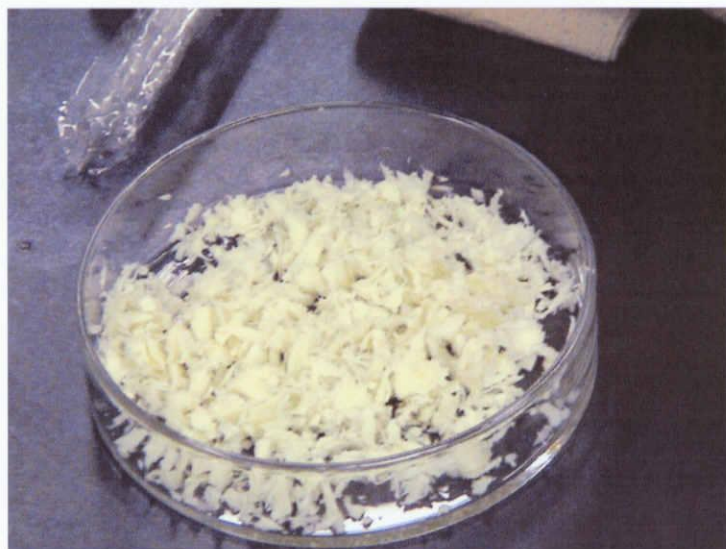


写真 2-1-2 抽出した不溶性エラスチン

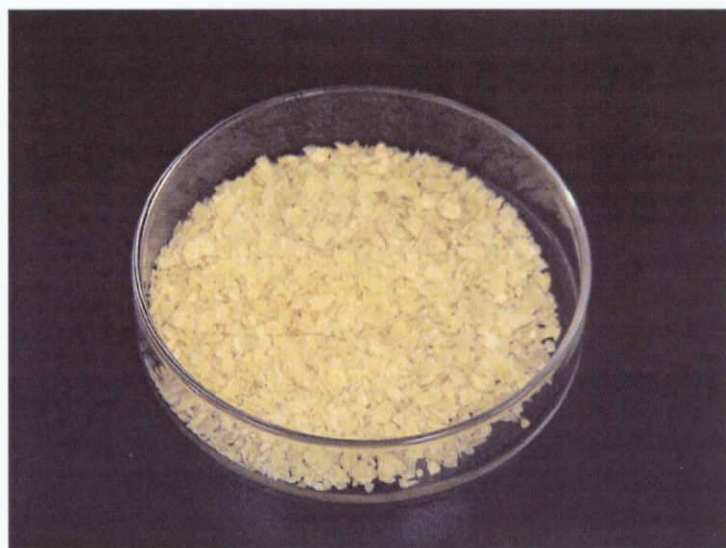


写真 2-1-3 抽出した不溶性エラスチン（乾燥後）

2-2 不溶性エラスチンの可溶化（水溶性エラスチンの調整）

[試薬・器具・機器]

- ・不溶性エラスチン
- ・シュウ酸（wako）
- ・50ml 遠沈管（IWAKI）
- ・吸引瓶（VIDREX）
- ・ガラスフィルター（ADVANTEC）
- ・凍結乾燥瓶（APPROX）
- ・透析用セルロースチューブ（三光純薬株式会社）
- ・オイルバス OSB-200（EYELA）
- ・遠心分離機 CT-6D（HITACHI）
- ・凍結乾燥機 FZ-4.5（LABCONCO）
- ・pH メーター D-50（HORIBA）

[方法]

- ① 抽出した不溶性エラスチンを 10 g ずつ取り、ガラス製遠沈管に入れた。0.25M シュウ酸を 45 ml ずつ加え、冷蔵庫に一晩保存した。
- ② 前処理した不溶性エラスチンを 100 °C のオイルバスで、1 h 加熱した後に、氷水で十分冷やし、遠心分離（3000 rpm、6 min）にかけた。
- ③ 上澄み液を除去分子量（10000～14000）のセロハン透析チューブで透析した。
- ④ 上澄み液回収後、新たに同濃度のシュウ酸 20 ml を加え、再度 100 °C で 1 h 加熱した。
- ⑤ エラスチンが全て解けるまで②から④の操作を繰り返した。
- ⑥ 上澄み液を入れた透析チューブを、水道水で 2～3 日間洗浄し、脱イオン水で透析し、外液の pH が 5～6 程度になるまで行った。
- ⑦ チューブから上澄み液を取り出し、遠心分離（3000 rpm、6 min）にかけた後に、上澄み液をガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液を 2～3 日間凍結乾燥し、水溶性エラスチンを得た。

[結果]

同様の実験を 3 度行い、その実験番号をそれぞれ PE10、PE11、PE12 と名付けた。PE10 と PE11 では不溶性エラスチンを計 80g、PE12 では 53.3g 用いた。

収率は以下の通り

PE10:80g の不溶性エラスチンから 20.6g の水溶性エラスチンが得られた（収率

25.8%)

PE11: 80g の不溶性エラスチンから 26.7g の水溶性エラスチンが得られた(収率 33.4%)

PE12: 53.3g の不溶性エラスチンから 14.2g の水溶性エラスチンが得られた(収率 26.6%)

表.加熱処理の回数毎にとれた水溶性エラスチンの質量

実験番号\加熱処理回数	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PE10(g)	0.37	0.36	0.36	0.51	0.88	1.87	3.14	10.09	3.02
PE11(g)	0.44	0.69	0.84	1.36	2.61	8.48	12.3		
PE12(g)	0.37	0.40	0.80	1.52	3.41	7.66			

以下 PE10 の加熱処理回数 1 回目(1 時間)のサンプルを PE10-1 加熱処理回数 2 回目(2 時間)のサンプルを PE10-2 と呼ぶ。

2-3 水溶性エラスチンの分類

2-3-1 凝集温度による分類

[試薬・器具・機器]

- ・ 水溶性エラスチン
- ・ フォトメーター(Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー(Uniphase)
- ・ 恒温槽(和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル
- ・ ねじ口試験管(マルエム)

[方法]

- ① ねじ口試験管で、水溶性エラスチンが濃度 1%(v/v)になるようにミリ Q を加え調整した。
- ② 溶液 2ml をディスポセルに移し変え透過光測定装置にセットした。
- ③ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1℃ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

[結果]

凝集温度を「透過光強度の最大値と最小値の midpoint の温度」として定義し、算出した凝集温度を表 2-4-1-1、2-4-1-2、2-4-1-3 にそれぞれ示す。短いシュウ酸加熱処理時間で溶出する水溶性エラスチンは凝集温度が高く、長い処理時間が必要なもののほど、凝集温度が低下することが分かった。

水溶性エラスチン凝集温度

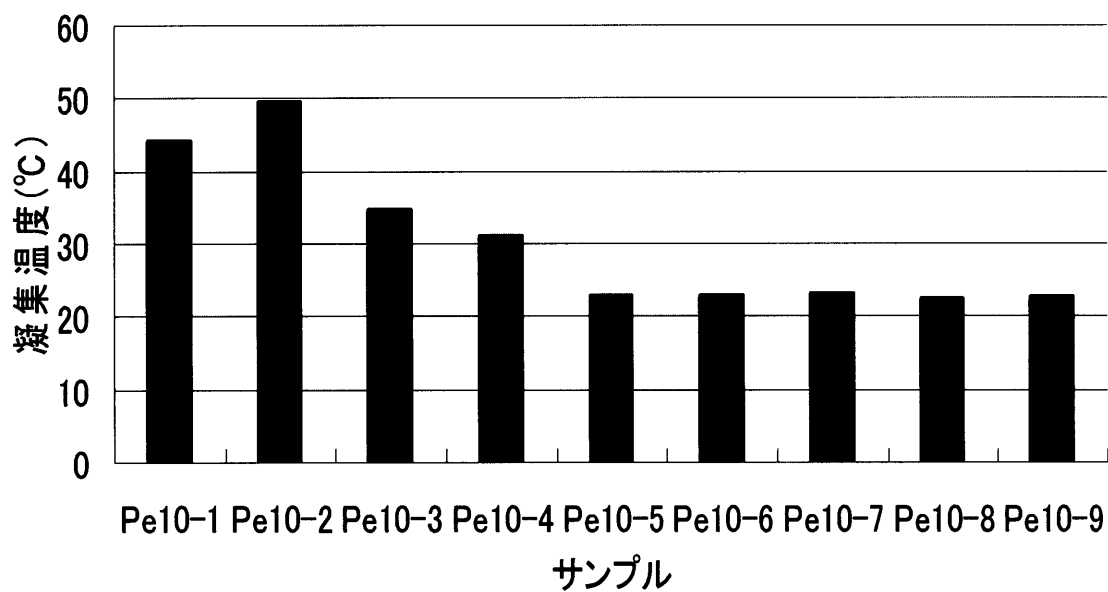


図.2-3-1-1 水溶性エラスチン(Pe10)の凝集温度

水溶性エラスチン凝集温度

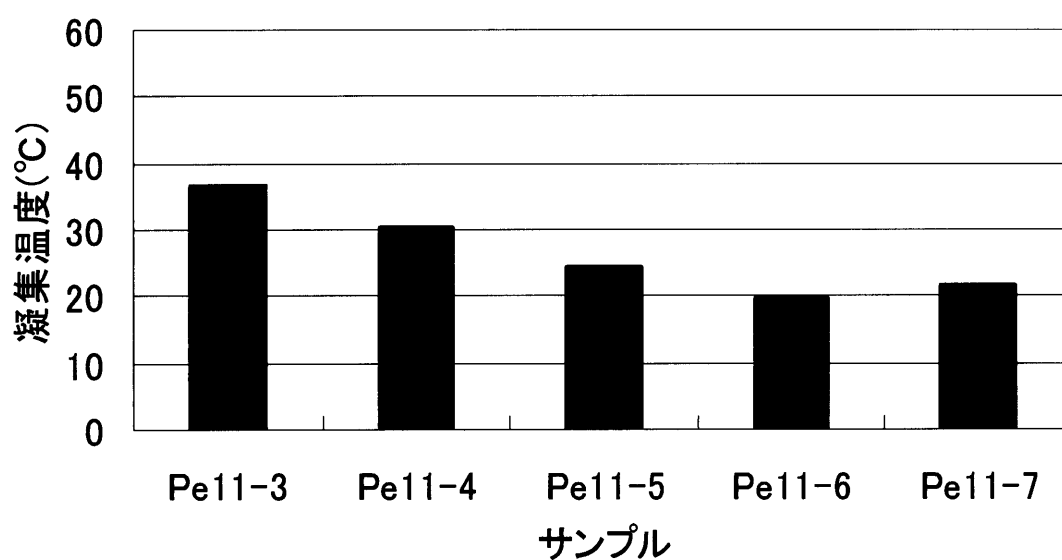


図.2-3-1-2 水溶性エラスチン(Pe11)の凝集温度

水溶性エラスチン凝集温度

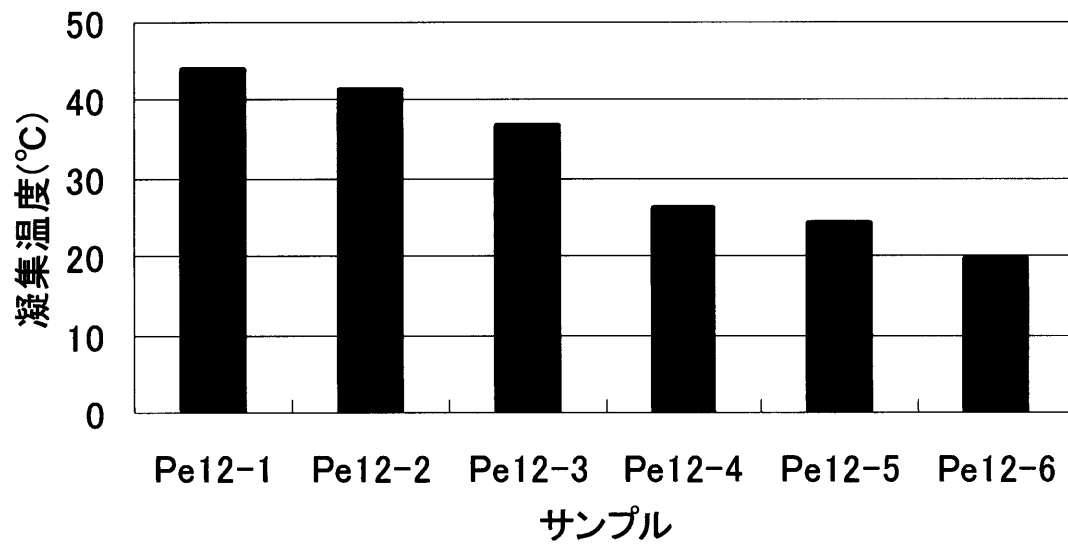


図.2-3-1-3 水溶性エラスチン(Pe11)の凝集温度

2-3-2 ゲル強度による分類

[試薬・器具・機器]

水溶性エラスチン

Dode-DSP

ミリ Q 水

15ml 遠沈管 (ono)

キャピラリーチューブ (内径 1.0mm 外形 1.55mm) (Flon Industry)

シリコンチューブ (AS ONE)

1.0ml シリンジ (TERUMO)

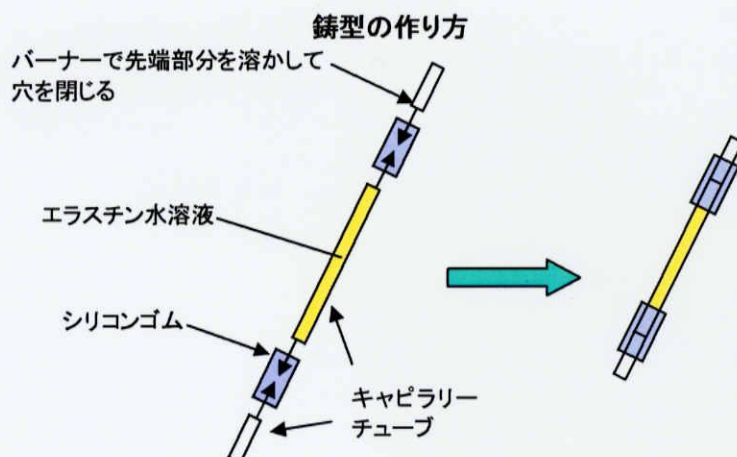
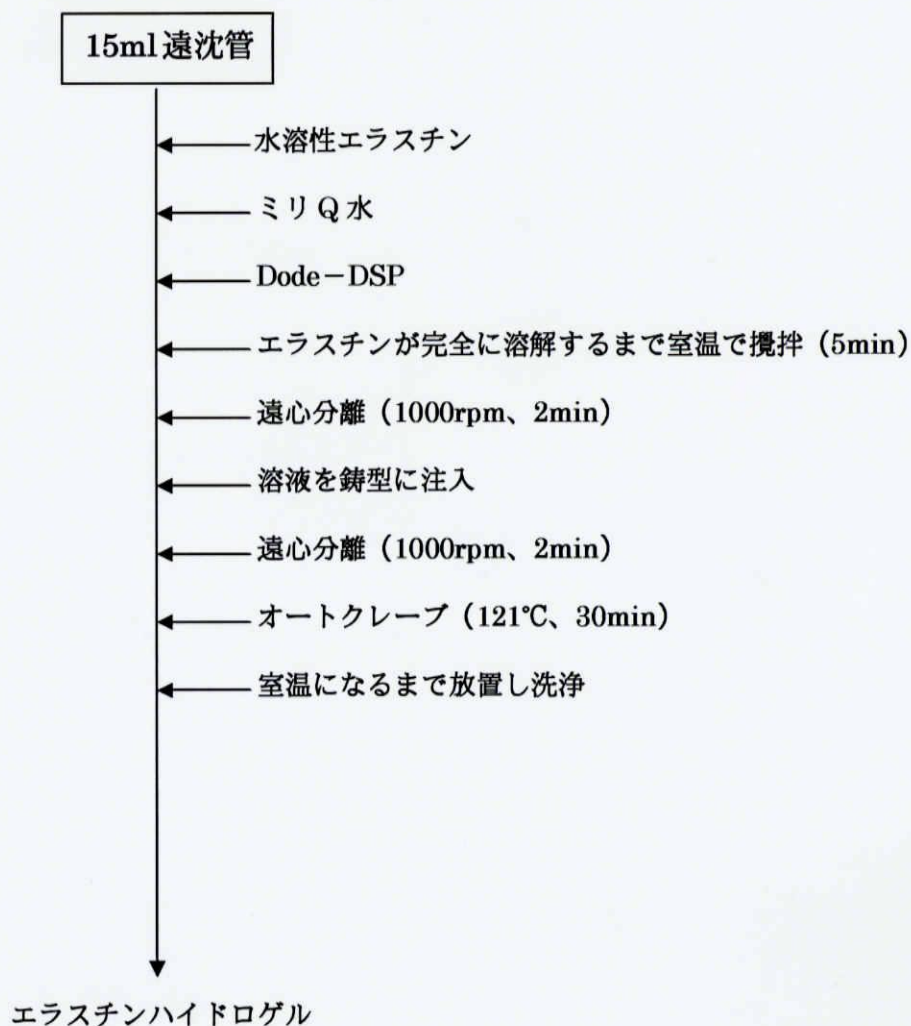
遠心分離機 CT-6D (HITACHI)

オートクレーブ IST-150 (Pasolina)

[方法]

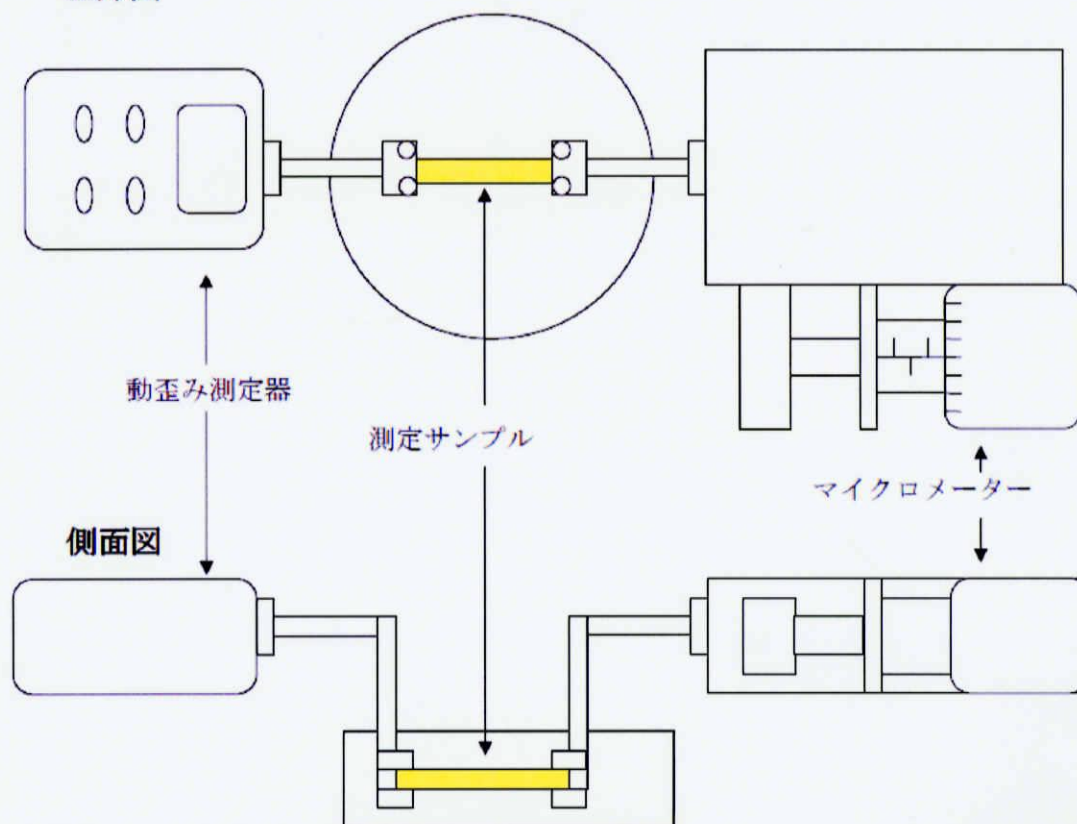
- ① 不溶性エラスチンから調整した水溶性エラスチンを使用して、30%のエラスチン水溶液になるようにエラスチンをとり、ミリ Q 水と架橋剤として Dode-DSP をエラスチンのアミノ基に対して 2 倍量加えた。
- ② ガラス棒で混合攪拌し完全に溶解させた後、遠心分離 (1000rpm、2min) して、脱気を行った。
- ③ 脱気したエラスチン水溶液を、キャピラリーに詰めて栓をして再び遠心分離 (1000rpm、2min) して脱気を行った。
- ④ エラスチン水溶液の入ったキャピラリーを蒸留水で満たされた試験管に入れて栓をして密封し、オートクレーブ (121℃、30min) で加熱した。
- ⑤ 加熱後、室温になるまで冷却し、エラスチンハイドロゲルを取り出し、蒸留水で洗浄した。

<エラスチンハイドロゲル作成 フローチャート>



上記の方法で作成したゲルを以下の装置と、方法で計算し、弾性率を測定した。

上方図



上記の装置を使用し、37℃で一秒間に0.5mmずつゲルを引っ張り、ひずみと応力そしてゲルが破断するまでのゲルの長さを測定し以下の式を用いて解析した。

$$\text{弾性率(Pa)} = (F/A) / \{(I - I_0)/I\} - ①$$

F: 応力(N) A: 断面積(m²) I₀: 自然長(m) I: ゲルの長さ(m)

[結果]

算出した弾性率は図 2-3-2-1～2-3-2-3 に示した。またグラフに載せてないサンプル(Pe10 なら Pe10-1 から Pe10-4)に関しては、ゲルにならないかゲルが弱過ぎて測定ができなかったものである。短い処理時間の間シュウ酸加熱処理で溶出した水溶性エラスチンほど、ゲル化した際のゲルの弾性率が低く(もしくは全くゲル化しない)、それに対して長い処理時間の間シュウ酸加熱処理で溶出した水溶性エラスチンほど、弾性率の高いゲルができた。

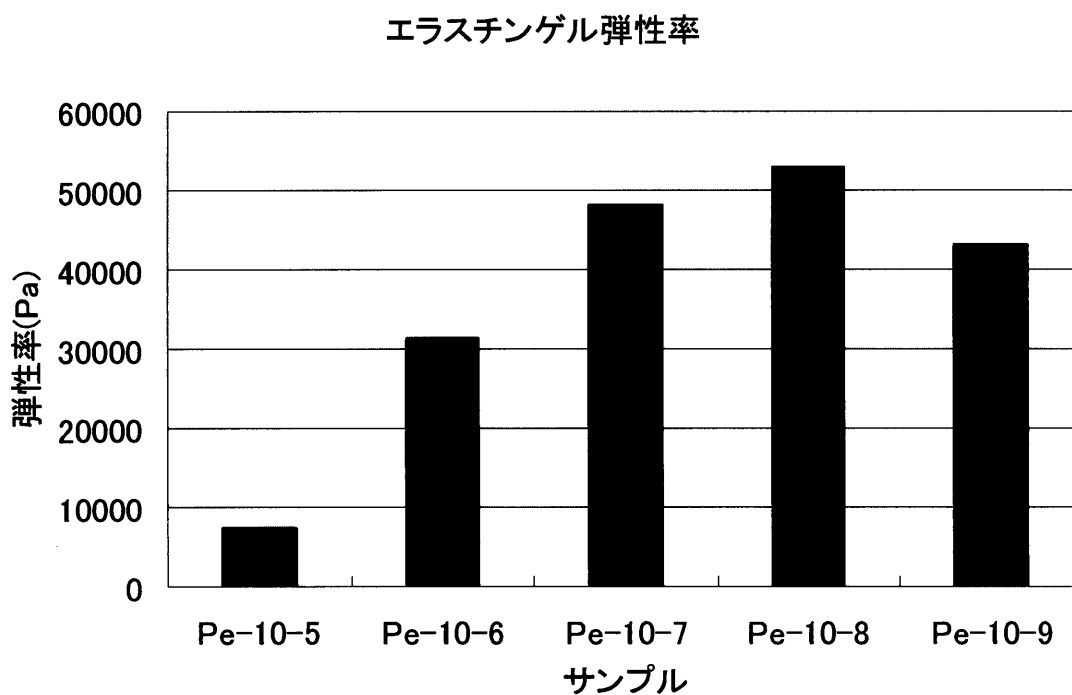


図.2-3-2-1 Pe10 で作成したエラスチンゲルの弾性率

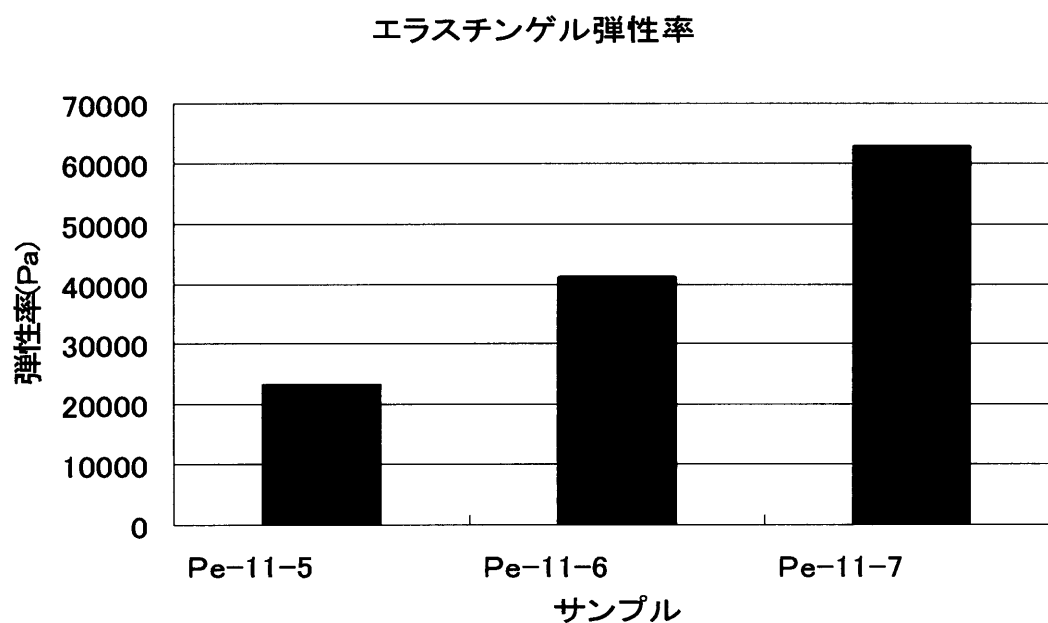


図.2-3-2-2 Pe11 で作成したエラスチンゲルの弾性率

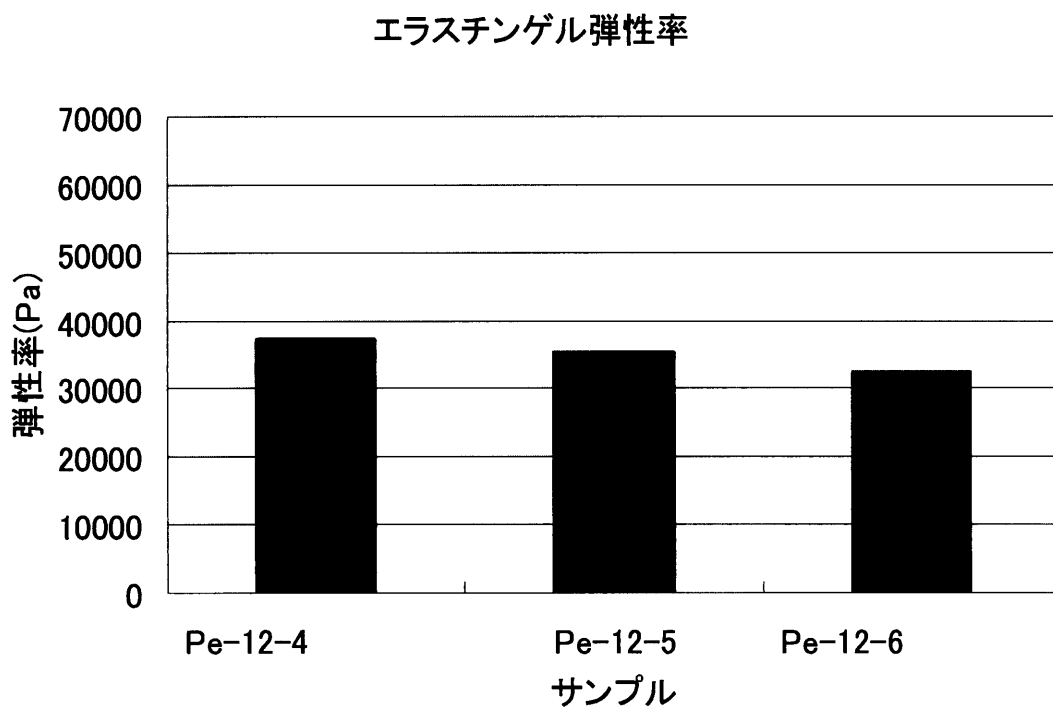


図.2-3-2-3 Pe12 で作成したエラスチンゲルの弾性率

さらに 2-2-1 と 2-2-2 の結果を合わせて表.2-3-2-1 の規則に従い、水溶性エラスチンのサンプルを A～E に分類した。具体的にどのサンプルを混合したかは表.2-3-2-2 に示す。

表.2-3-2-1 サンプル分類における規格（任意の基準）

方法	A	B	C	D	E
凝 集 温 度 (℃)	～22.5 未満	22.5～25 未満	25～30 未満	30～35 未満	35～
ゲル弾性率 (Pa)	45000 以上	～ 25000 以上	～5000 以上	5000 未満	ゲル化しない

表.2-3-2-2 実際に分類規格に従って分類した水溶性エラスチン

A	B	C	D	E
10-7	10-6	10-5	10-3	10-1
10-8	12-5	11-5	10-4	11-1
11-6			11-4	11-2
11-7				11-3
12-6				12-1
				12-2

2-4 水溶性エラスチンの性質

2-4-1 凝集温度測定

[目的]

シュウ酸処理時間ごとに回収し、それぞれの凝集温度およびゲルの弾性率を測定したサンプルを、前述した任意の規格に従ってタイプ別に分類する。その後、再度全ての水溶性エラスチン試料をタイプごとに混合し、水溶性エラスチン(タイプ A~E)を調整する。

得られた水溶性エラスチン(タイプ A~E)の凝集温度を測定し、規格化の確認を行う。

[試薬・器具・機器]

- ・ 水溶性エラスチン(A~E)
- ・ フォトメーター(Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー(Uniphase)
- ・ 恒温槽(和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル
- ・ ねじ口試験管(マルエム)

[方法]

- ① ねじ口試験管で、水溶性エラスチンが濃度 1%(v/v)になるようにミリ Q を加え調整した。
- ② 溶液 2ml をディスポセルに移し変え透過光測定装置にセットした。
- ③ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1℃ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

[結果]

水溶性エラスチン A~E の透過光強度測定の結果(図.2-4-1-1)から求めた凝集温度は、図.2-4-1-2 のようになった。またその実測値と分類の基準値とで比較してみると(表.2-4-1-1) 2-3 で提示した分類方法の凝集温度基準に則した結果となった。即ち、今後の水溶性エラスチン試料の基準をこのように決定した後使用することで、試料の性質の安定化を行うことが可能になった。

表.2-4-1-1 凝集温度による分類と実測値

方法	A	B	C	D	E
基準値	～22.5 未満	22.5～25 未満	25～30 未満	30～35 未満	35～
実測値	21.3	23.5	28.7	31.7	37.6

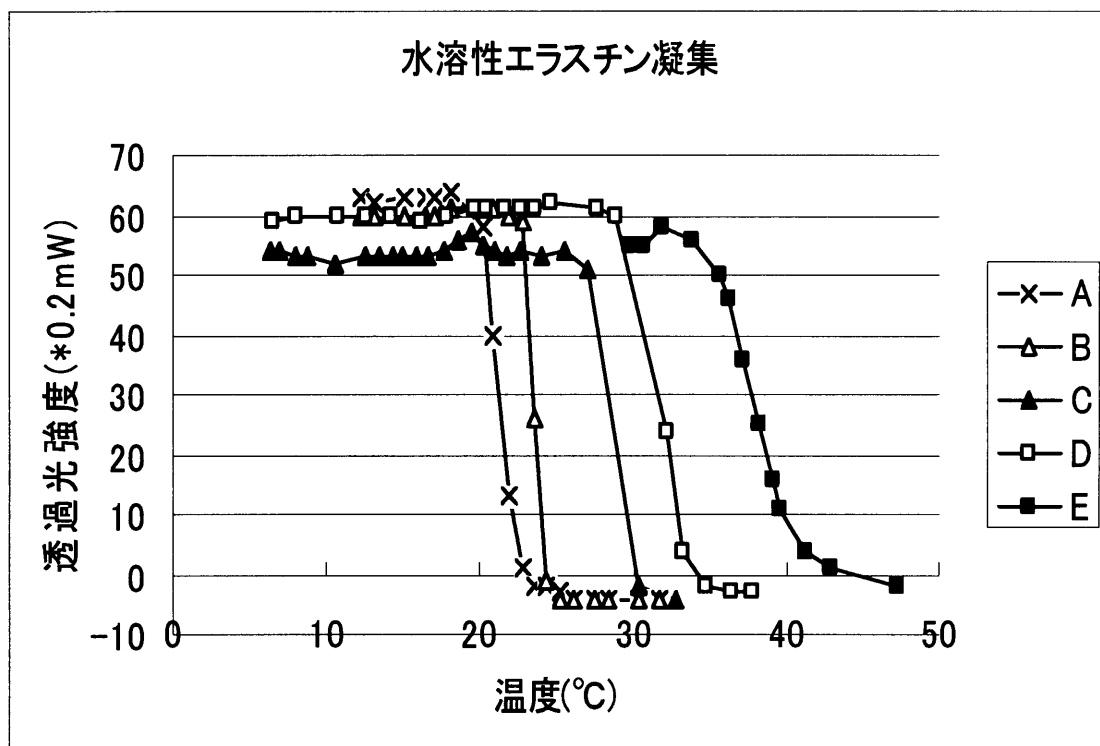


図.2-4-1-1 サンプル A～E の透過光強度測定

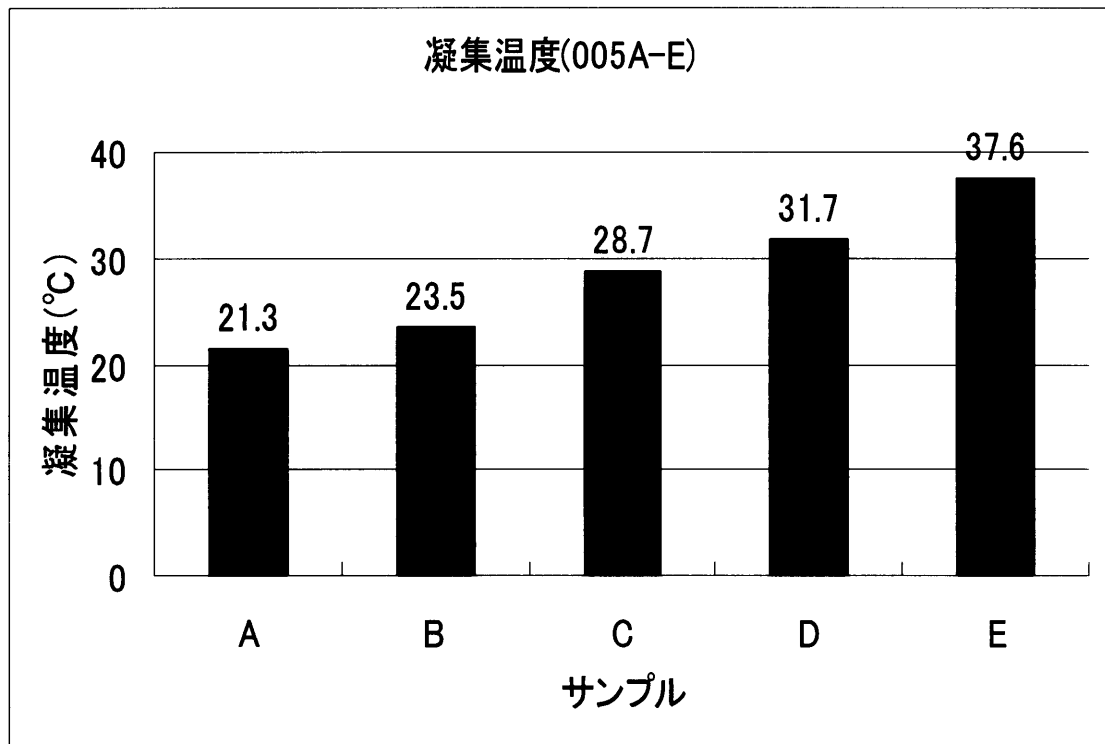


図.2-4-1-2 サンプル A～E の凝集温度

2-4-2 ゲル強度測定

[目的]

2-4-1 で述べたように、任意の基準に従って分類後、混合した水溶性エラスチン(タイプ A~E)のゲル強度を測定した。

[試薬・器具・機器]

水溶性エラスチン

Dode-DSP

ミリ Q 水

15ml 遠沈管 (ono)

キャピラリーチューブ (内径 1.0mm 外形 1.55mm) (Flon Industry)

シリコンチューブ (AS ONE)

1.0ml シリンジ (TERUMO)

遠心分離機 CT-6D (HITACHI)

オートクレーブ IST-150 (Pasolina)

[方法]

- ① 不溶性エラスチンから調整した水溶性エラスチンを使用して、30%のエラスチン水溶液になるようにエラスチンをとり、ミリ Q 水と架橋剤として Dode-DSP をエラスチンのアミノ基に対して 2 倍量加えた。
- ② ガラス棒で混合攪拌し完全に溶解させた後、遠心分離 (1000rpm、2min) して、脱気を行った。
- ③ 脱気したエラスチン水溶液を、キャピラリーに詰めて栓をして再び遠心分離 (1000rpm、2min) して脱気を行った。
- ④ エラスチン水溶液の入ったキャピラリーを蒸留水で満たされた試験管に入れて栓をして密封し、オートクレーブ (121℃、30min) で加熱した。
- ⑤ 加熱後、室温になるまで冷却し、エラスチンハイドロゲルを取り出し、蒸留水で洗浄した。
- ⑥ 37℃で一秒間に 0.5mm ずつゲルを引っ張り、ひずみと応力そしてゲルが破断するまでのゲルの長さを測定し、弾性率及び伸長率を算出した。

[結果]

分類の基準値と実測値を比較してみると(表.2-4-2-1) 2-3 で提示した分類方法の基準に則した結果となった。D はゲルが脆く壊れてしまい測定できなかった。

たが、弱くではあるがゲル化には成功しているため、実質基準に合致しているとみなせる。

弾性率はタイプ A から C になるに従って低下していくが、逆に伸長率は A から C になるに従って上昇していく。つまり、A は比較的強固で伸びない素材、C になると柔らかく伸び易くなる素材であることが分かった。

表.2-4-2-1 弾性率による分類と実測値

	A	B	C	D	E
基準値(Pa)	45000 以上	～25000 以上	～5000 以上	5000 未満	ゲル化しない
実測値(Pa)	52829	38357	16108	測定不能	ゲル化しなかった

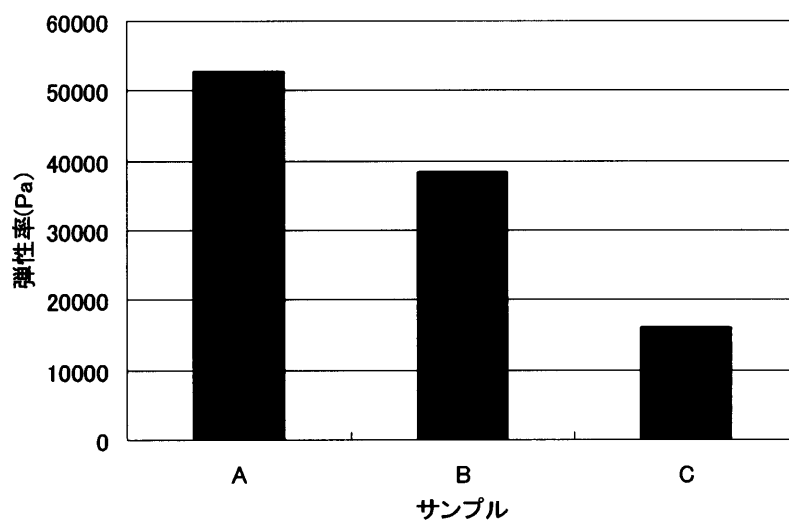


図.2-4-2-1 サンプル A～E 弾性率

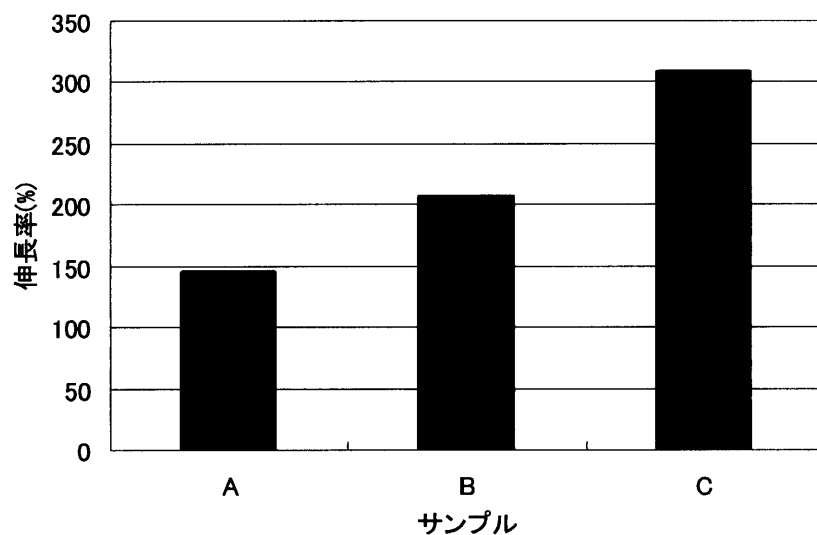


図.2-4-2-1 サンプル A～E 伸長率

一定の条件下で作成したエラスチンゲルの弾性率に関しても、混合試料でも問題なく基準値に入っていた。以上の検討より、水溶性エラスチン試料の調節の安定化が可能になったと考えられる。

2-4-3 HPLC 測定

[目的]

水溶性エラスチン(タイプ A~E)の分子量を測定する

[分離条件]

表 2-4-3-1

カラム	東ソー 3000SW
溶出液	0.1M PBS + 0.1M NaCl (pH 7)
溶出温度	5~10℃
Flow rate	0.5ml/min
Sample loop	20 μ l
Sample 濃度	8~10mg/ml
Sample 処理	0.22 μ m フィルター濾過処理
Scale	0.005
検出	UV 280nm
総溶出時間	35~40min (17.5~20ml)

[結果]

HPLC 用較正曲線

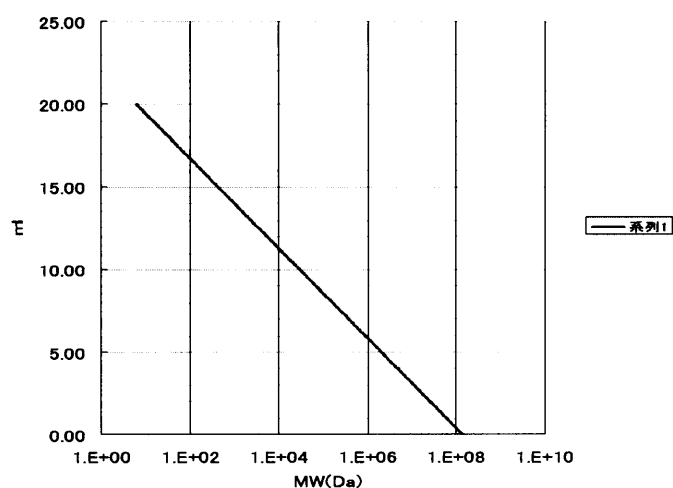


図 2-4-3-1 較正曲線

(平均分子量算出方法)

検出縦軸の出力電圧は濃度 (mol 濃度) に比例すると仮定して、数平均分子量を算出した。

$$\begin{aligned}\langle M_n \rangle &= [NA \Sigma N \times Mw] / [NA \Sigma N] \\ &= [\Sigma V \times Mw] / [\Sigma V] \quad (\text{ただし } C=A \times V \text{ とする})\end{aligned}$$

エラスチン A, B, C, D, E+EPC 社製の水溶性エラスチンのクロマトグラムを以下に示す

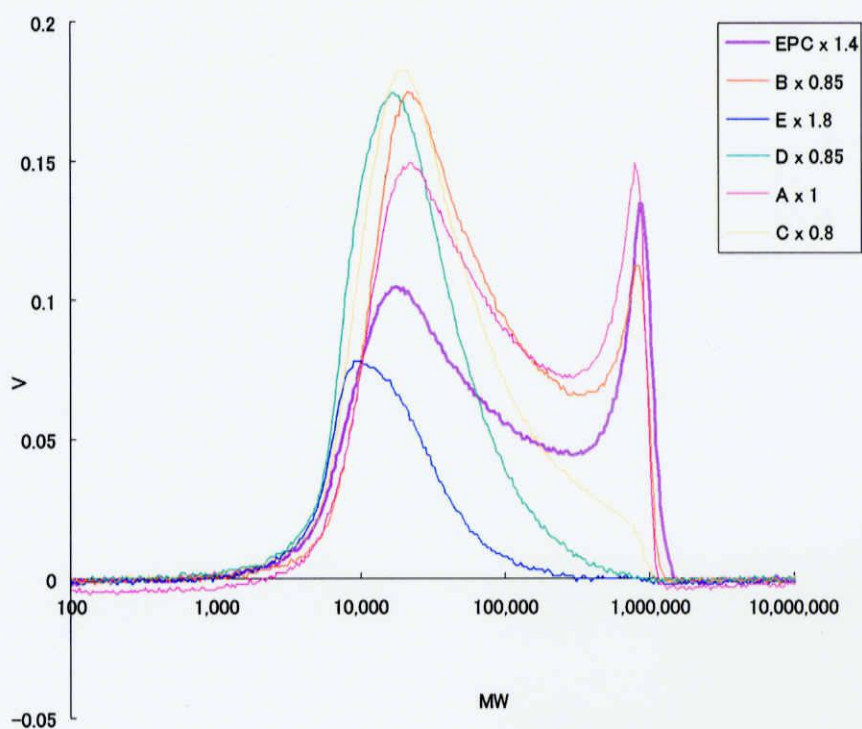


図 2-4-3-2 エラスチン A, B, C, D, E のクロマトグラム

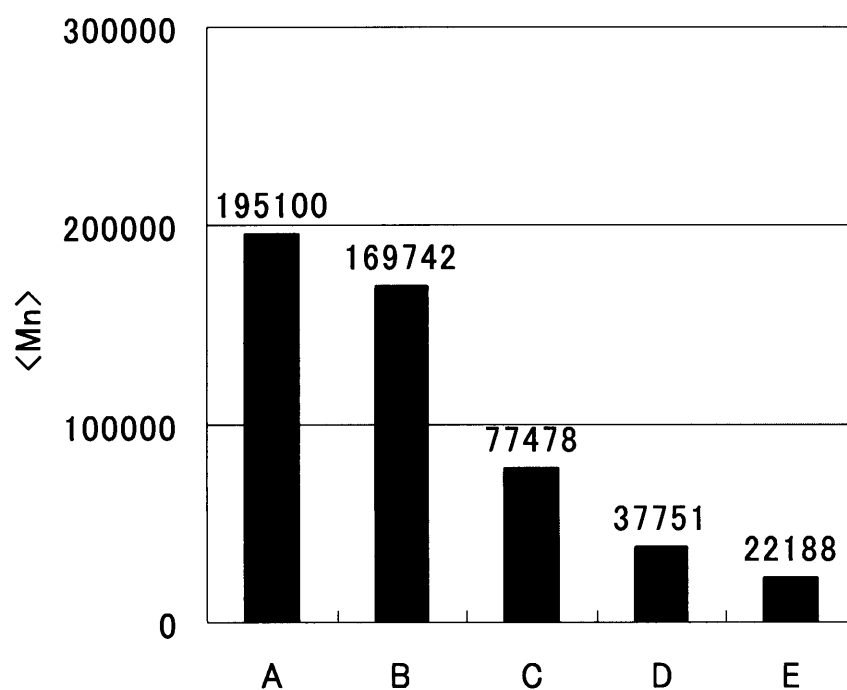


図 2-4-3-3 数平均分子量

表 2-4-3-2 凝集温度およびゲル弾性率より分類したエラスチンと平均分子量

	A	B	C	D	E
平均分子量 (kDa)	195	170	77	38	22

今回、任意に設定した基準で分類した水溶性エラスチンのタイプが A から E になるにつれ、平均分子量が低下した。特にタイプ A および B の分画には、一部超高分子量(500kDa 以上)の分子が含まれていることがわかった。

2-5 考察

ブタ大動脈血管からエラスチンを抽出し、さらに水溶化することに成功した。特に短いシュウ酸加熱処理時間（1 から 3 時間程度）で溶出する水溶性エラスチンは凝集温度が高く、ゲルにした時の弾性率が小さいことが分かった。また水溶性エラスチンの凝集温度またゲル化した際の弾性率で分類することで、以後少なくとも、力学強度の面で安定したサンプルを供給できるものと考ええる。

HPLC による分子量分布の分析から、エラスチンのシュウ酸加熱処理の時間を増加するにしたがって（つまりサンプル E から A になるにしたがって）、溶出してくるエラスチンの分子量が大きくなることが分かった。これは、シュウ酸処理初期では、エラスチンの架橋を形成しているデスモシンやイソデスモシンの未完成架橋部分や、架橋結合の弱い部分がまず始めに切断され、低分子量エラスチン（～14kDa）として溶出してきたものだと考えられる。その後、架橋構造が完全に破壊され、高分子量エラスチン（約 70 kDa）が溶出してきたのではないかと推測される。即ち、凝集温度とゲル弾性率の変化の一因として水溶性エラスチンの分子量の影響があると思われる。

3章 凝集温度と相互作用

目的

生体内では、細胞から産出されたエラスチンの前駆体であるトロポエラスチンが凝集しコアセルペーション（液液相分離）し、更にコアセルペーションが起こった後に架橋構造を形成しエラスチンが生成される。そのため生体組織中の細胞外マトリックスのエラスチン分子同士が形成する構造はコアセルペーションの状態に依存していると考えられる。

一方、本研究で行った方法により抽出した不溶性エラスチンを水溶化した水溶性エラスチンでも同様に凝集、コアセルペーション、および架橋剤による架橋反応という手順を踏んでゲルを作成することが出来る。即ち、水溶性エラスチンの構造形成の初期段階である凝集を制御することで、その後のコアセルペーション構造およびゲル化した時の力学特性（弾性率や伸縮性など）が制御可能と思われる。

そこで本章では、前章で調整し規格化したエラスチンの凝集温度に与える様々な影響を、添加物等の外部環境を変えることで測定し、その際に働くエラスチン分子間の相互作用を考察し、凝集状態を制御する条件を検討することを目的とした。

3-1 添加物による凝集温度の変化

3-1-1 イオンの影響

[目的]

水溶性エラスチン水溶液に金属イオンを加えることで、水溶性エラスチン同士に存在する静電相互作用を変化させ、凝集における静電相互作用の役割を推察した。また価数とイオン半径の影響も調べた。

[試薬・器具・機器]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ 塩化ナトリウム (Wako)
- ・ 塩化カリウム (Wako)
- ・ 塩化カルシウム (Wako)
- ・ 塩化鉄(II)六水和物(NACALAI TESQUE, INC)
- ・ 塩化アルミニウム(III)六水和物(Wako)
- ・ 塩化鉄(III)六水和物(Wako)
- ・ フォトメーター(Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー(Uniphase)
- ・ 恒温槽(和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル
- ・ ねじ口試験管(マルエム)

[方法]

- ① 塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化鉄(II)六水和物、塩化アルミニウム(III)六水和物、塩化鉄(III)六水和物をそれぞれ 2M、1M、0.5M、0.1M、0.01M、0.001M の水溶液に調整した。
- ② ねじ口試験管で、水溶性エラスチンが濃度 1%(v/v)になるようにそれぞれの水溶液を加え調整した。
- ③ 溶液 2ml をディスポセルに移し、透過光測定装置にセットした。
- ④ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1℃ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

[結果]

アルミニウム(III)六水和物の 0.05M と、塩化鉄(III)六水和物の 0.01M は温度

を 80℃以上に上げてても凝集しなかった。

全体として塩を添加すると、全て濃度依存的に凝集温度が上昇し、ある点を越えると再び凝集温度が低下する傾向を示した。

一価の塩化ナトリウムと塩化カリウム、二価の塩化カルシウムと塩化鉄(II)六水和物、三価の塩化アルミニウム(III)六水和物と塩化鉄(III)六水和物を同じ価数同士で比較すると、ほとんど凝集温度変化に違いがなかった。一方、違う価数で比較すると、一価と二価ではその違いが小さいが、三価の場合では大きな変化が見られた。

水溶性エラスチン凝集NaCl添加

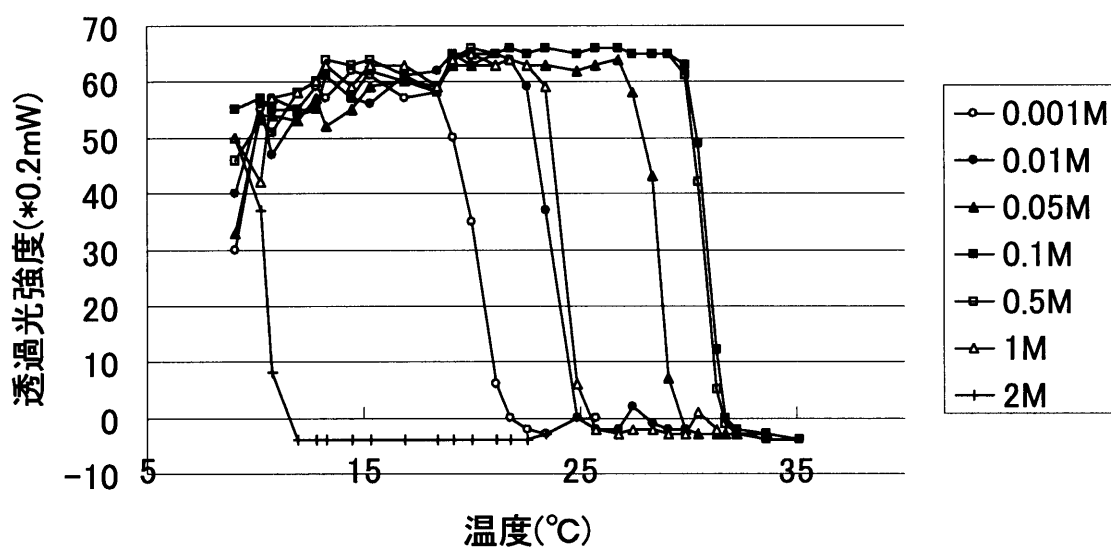


図.3-1-1-1 NaCl 濃度と透過光強度

水溶性エラスチン(A,1%)凝集KCl添加

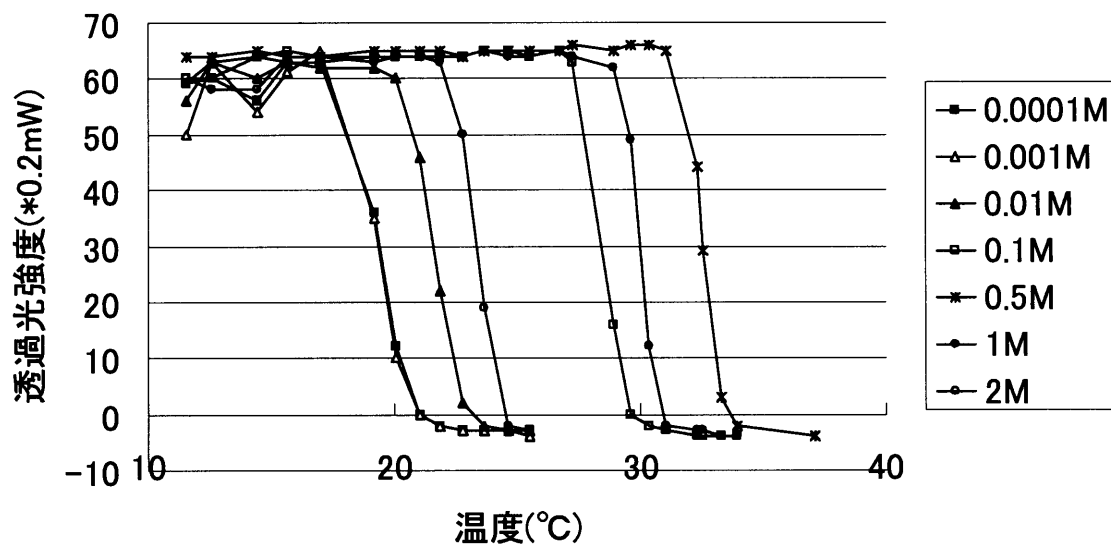


図.3-1-1-2 KCl 濃度と透過光強度

水溶性エラスチン凝集, MgCl₂添加

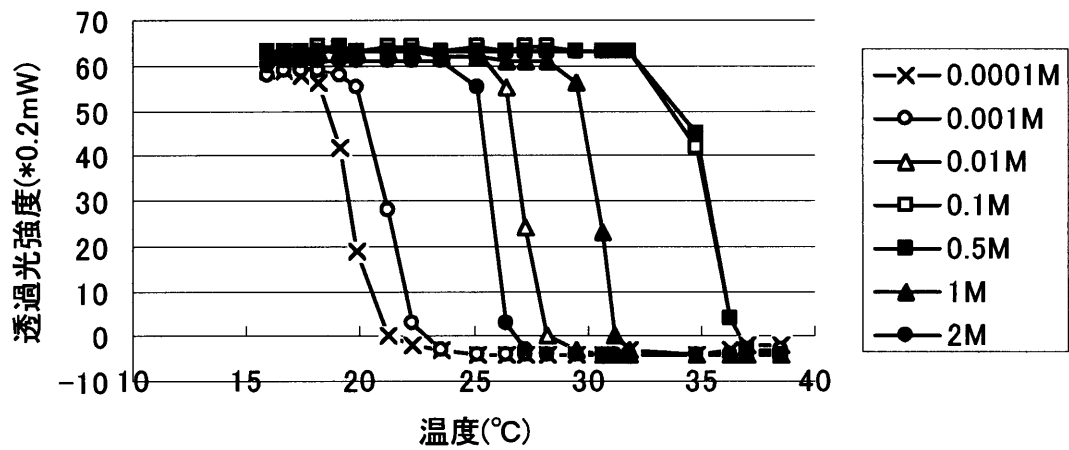


図.3-1-1-3 MgCl₂ 濃度と透過光強度

水溶性エラスチン凝集FeCl₂添加

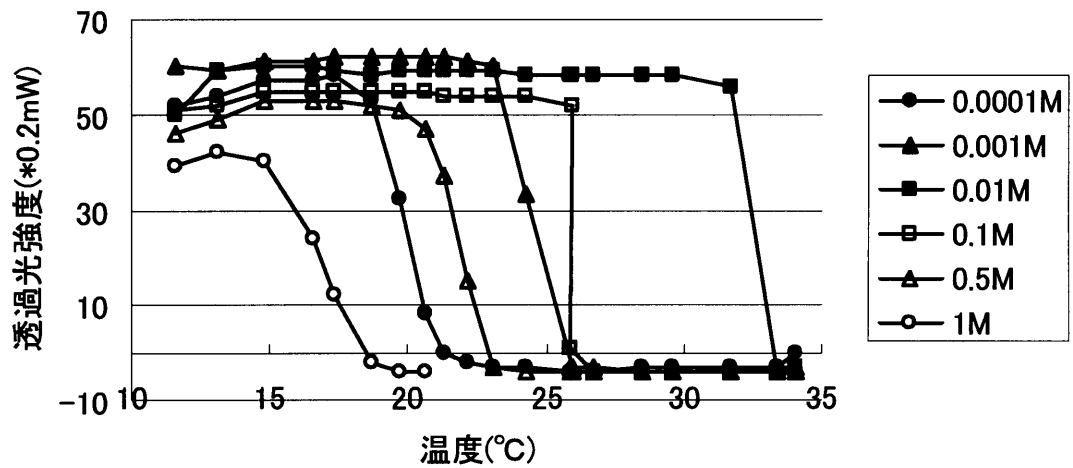


図.3-1-1-4 FeCl₂ 濃度と透過光強度

水溶性エラスチン(A1%)凝集 AlCl_3 添加

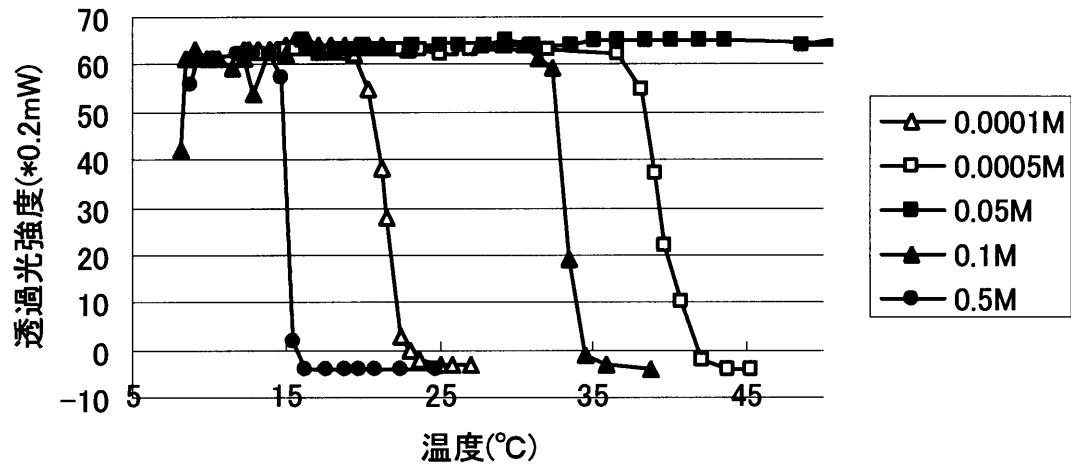


図.3-1-1-4 AlCl_3 濃度と透過光強度

水溶性エラスチン(A,1%)凝集 FeCl_3 添加

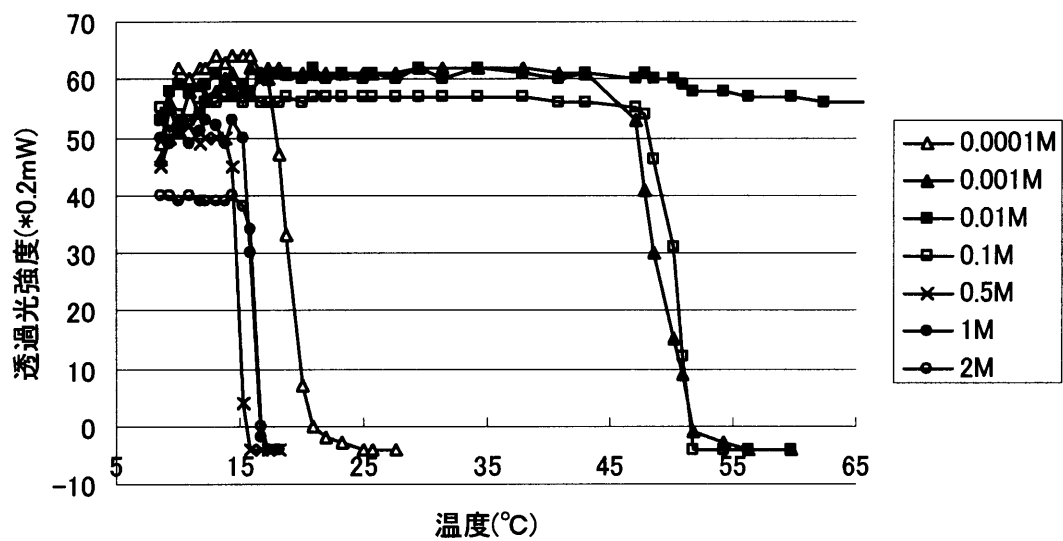


図.3-1-1-5 FeCl_3 濃度と透過光強度

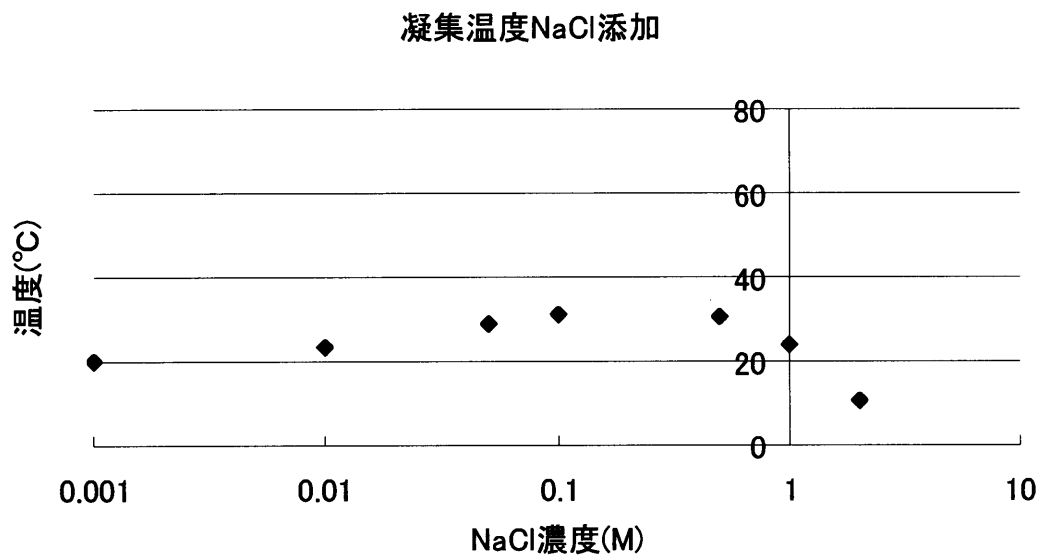


図.3-1-1-6 NaCl 濃度と凝集温度

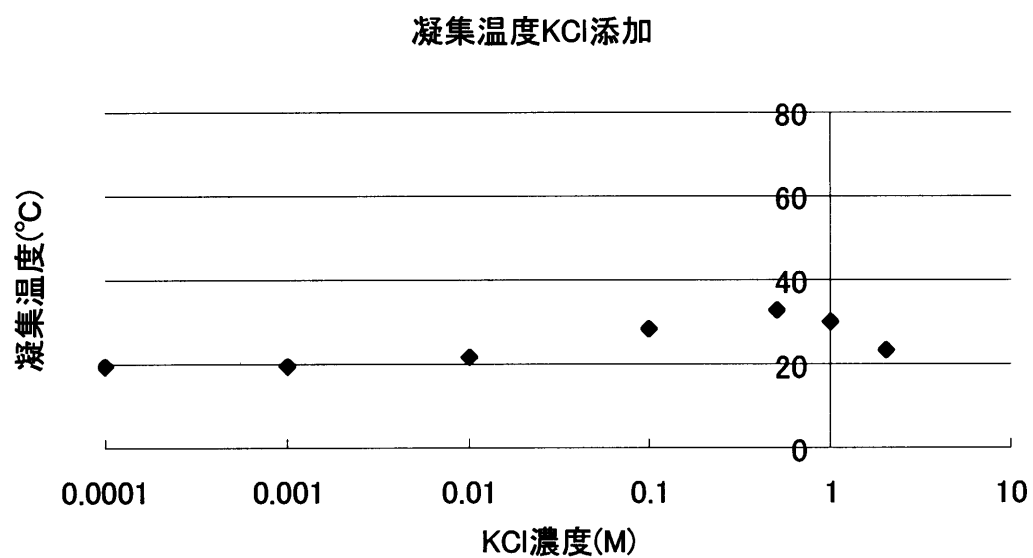


図.3-1-1-7 KCl 濃度と凝集温度

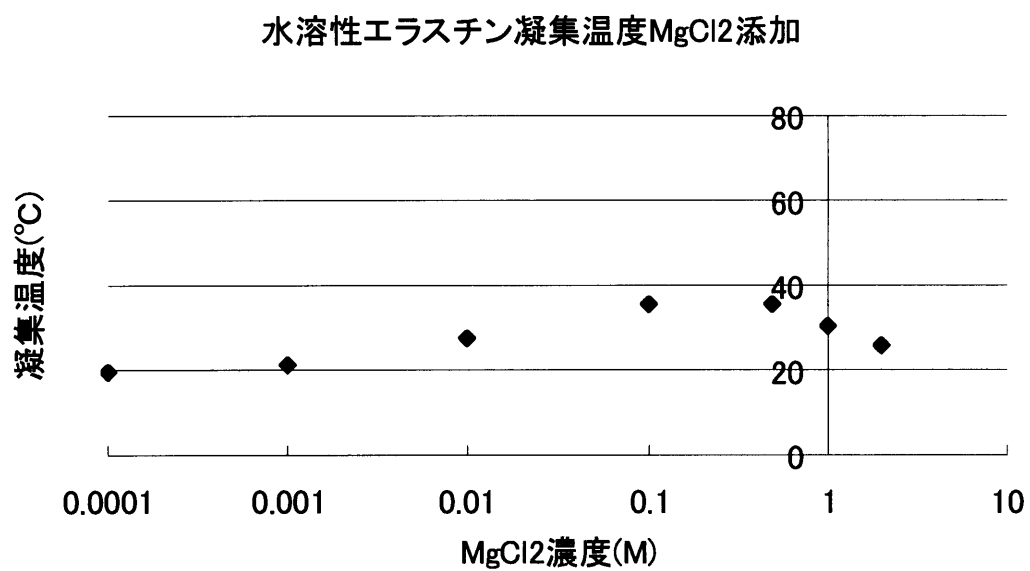


図.3-1-1-7 MgCl₂ 濃度と凝集温度

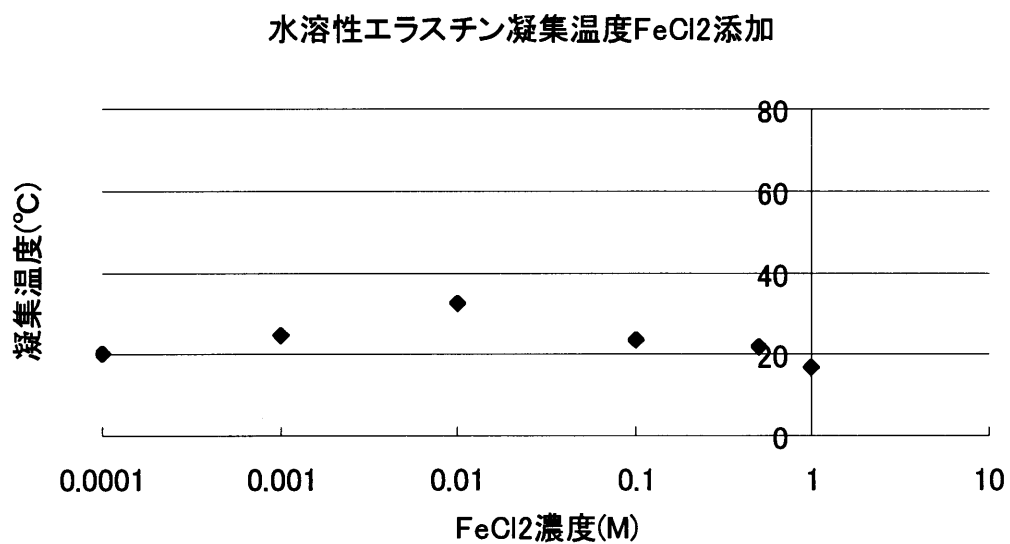


図.3-1-1-8 FeCl₂ 濃度と凝集温度

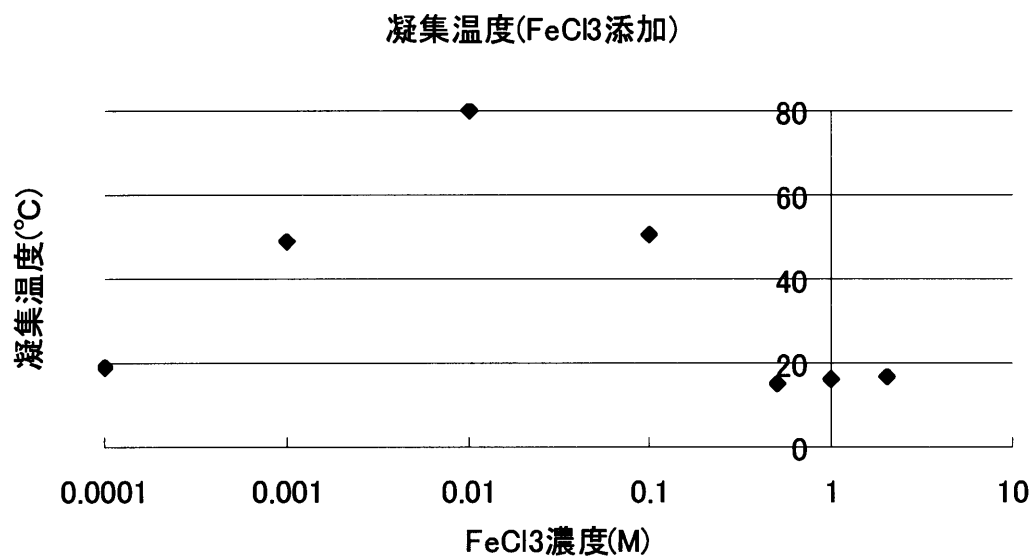


図.3-1-1-9 FeCl_3 濃度と凝集温度

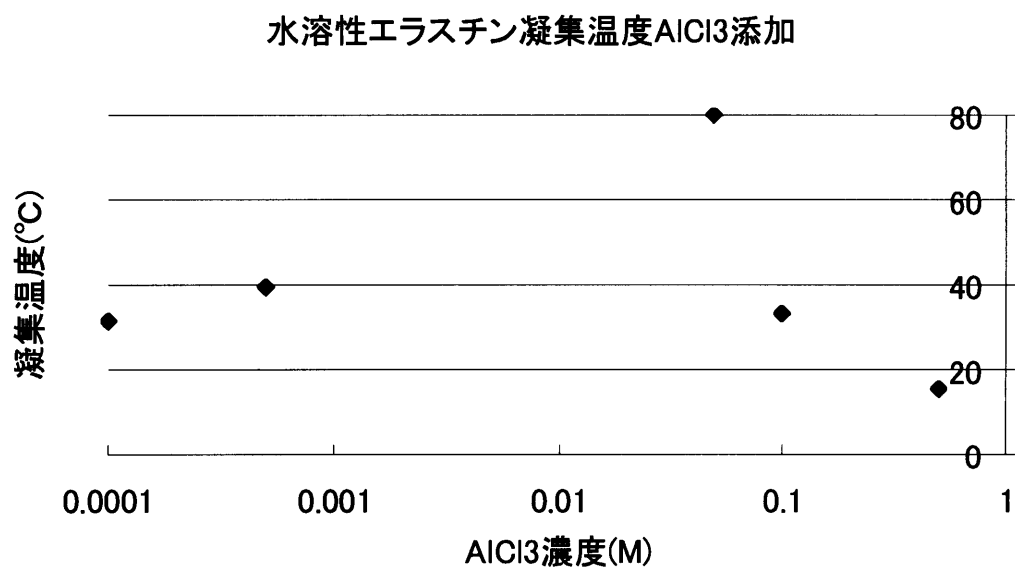


図.3-1-1-10 AlCl_3 濃度と凝集温度

水溶性エラスチン凝集温度塩添加

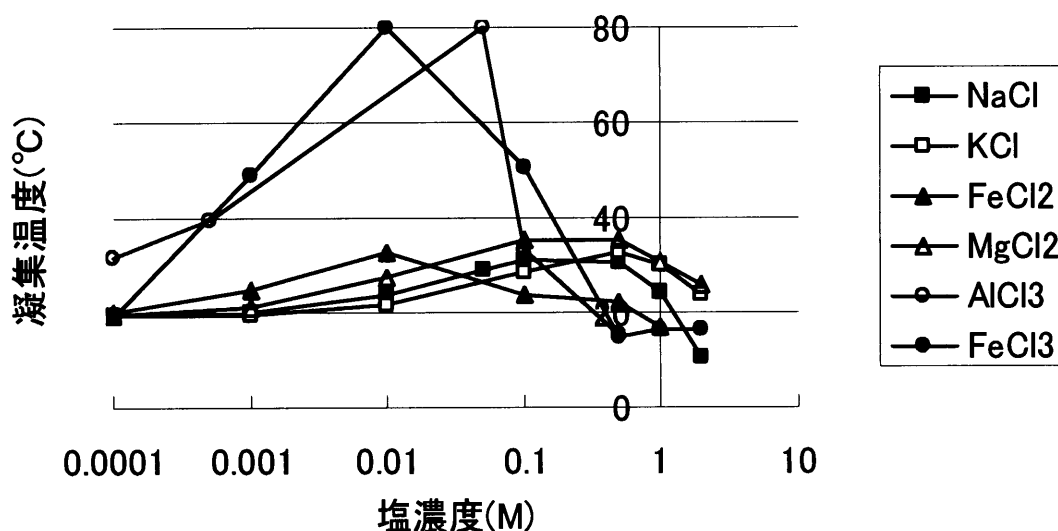


図.3-1-1-10 塩添加と凝集温度

[考察]

塩を添加すると、全ての傾向として、塩濃度依存的に凝集温度が上昇し、ある点から凝集温度が低下した。これは塩添加によって水溶性エラスチン同士の静電相互作用が弱くなるからと考えられる。またある点から凝集温度が低下するのは、塩が過剰に存在することによって、水への溶解度が低下することによる塩析効果のためだと考えられる。つまり水溶性エラスチン同士の相互作用は弱くなっていくので凝集温度が上昇していくが、ある点を越えると塩析の効果が逆転して凝集温度が低下する現象と考えられる、つまり凝集温度が低下しているとはいえ、水溶性エラスチン分子自体の凝集能は強くなっていないと思われる。1価、2価のカチオンに比べて、3価のカチオンを加えると凝集温度が非常に高くなる。それは、1価、2価の単純な静電相互作用とは別に、エラスチン分子に対して特有の選択的効果の存在を示唆していると思われる。

3-1-2 pH の影響

[目的]

水溶性エラスチン水溶液の pH を変化させることで、水溶性エラスチン同士に存在する電荷の量を変化させ、凝集における電荷の役割を推察した。

[試薬・器具・機器]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ 水酸化ナトリウム (Wako)
- ・ 塩酸 (Wako)
- ・ フォトメーター(Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー(Uniphase)
- ・ 恒温槽(和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル($l=1.0\text{cm}$)
- ・ ねじ口試験管(マルエム)

[方法]

- ① 水酸化ナトリウム(0.001M)と塩酸(0.001M)を混合し、pH3.06、3.96、5.01、7.11、9.01、9.91、にそれぞれ調整した。
- ② ねじ口試験管で、水溶性エラスチン(A)が濃度 1%(v/v)になるようにそれぞれの水溶液を加え調整した。
- ③ 溶液 2ml をディスポセルに移し、透過光測定装置にセットした。
- ④ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1℃ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

[結果]

pH 中性条件近くではほぼ変化がないが、酸性(アルカリ性)が強くなると凝集温度が上昇した。

水溶性エラスチン凝集

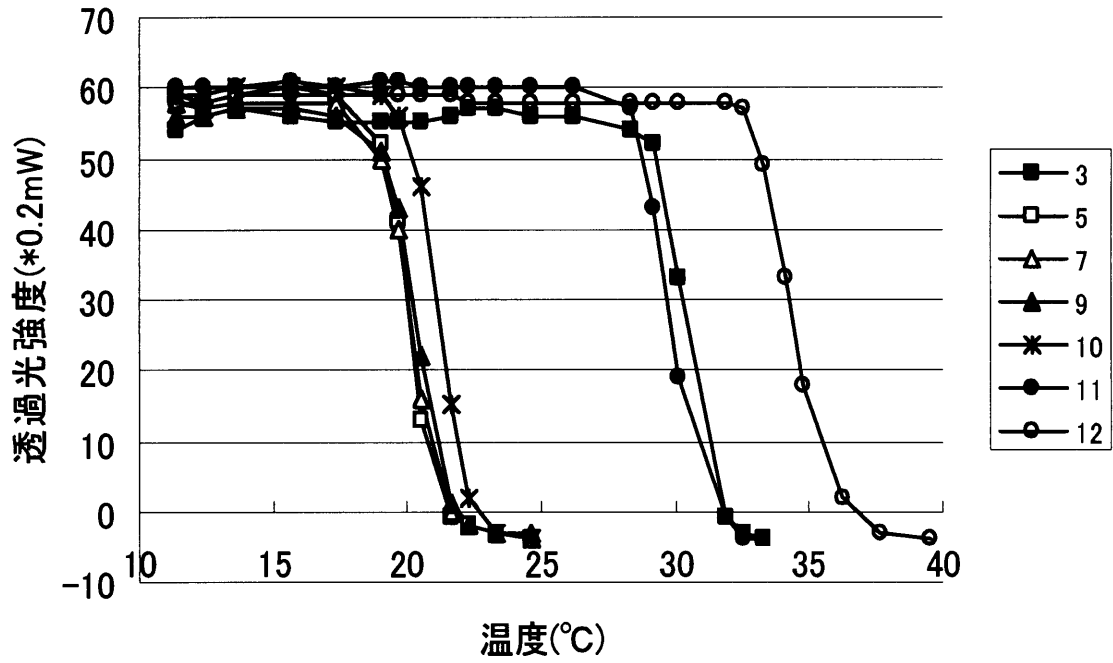


図.3-1-2-1 pH 変化と凝集

水溶性エラスチン凝集温度pH添加

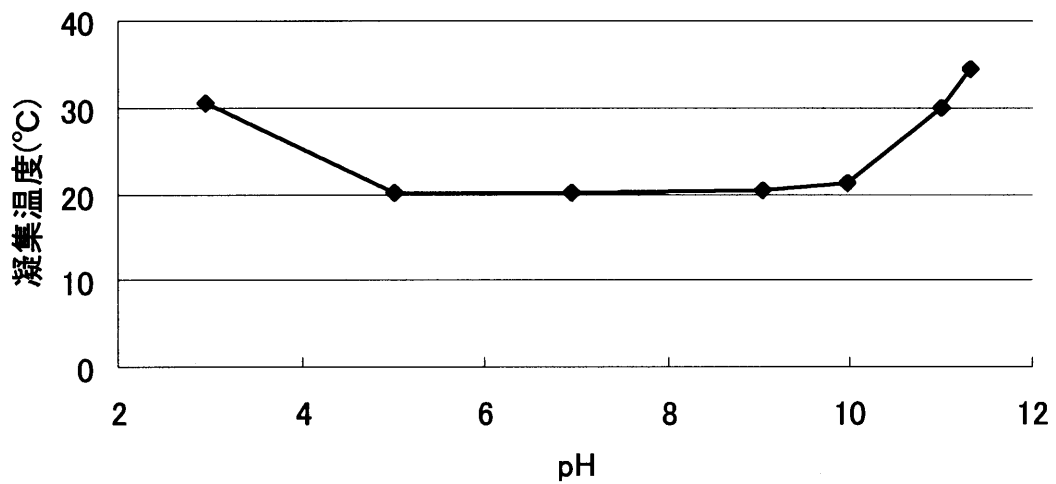


図.3-1-2-2 pH 変化と凝集温度

[考察]

pH が中性条件から離れるほど、凝集温度が上昇した。これはアルカリ条件では塩基性アミノ酸であるリシンやアルギニン、ヒスチジンのアミノ基、グアニジノ基、イミダゾール基の解離し、酸性アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸のアルボキシル基が解離することによって、水溶性エラスチンが負の帯電に傾いていくためマイナス電荷の斥力が働き、水溶性エラスチンの会合を妨げるためではないかと考えられる。

また酸性条件では、逆の現象が起こるため正の電荷を持つようになる。すると同様に負電荷同士の斥力が強くなり、水溶性エラスチンの会合を妨げていると考えられる。また水溶性エラスチンのアミノ酸配列から算出した等電点は、pH5~6 程度であるが、エラスチンの水溶化の際に、本来の架橋構造であるデスマシン構造が切断されずに残っている可能性も考えられるので、実際の等電点は pH7 に近い値である可能性を示唆している。そのため、本実験の結果のように中性条件下での凝集温度が低く、即ち凝集性が高まっていると考えられる。

3-1-3 疎水性相互作用の影響

[目的]

水溶性エラスチンは、自身の持つ疎水基同士の疎水性相互作用によって凝集、コアセルベーションを引き起こすと考えられている。そこで水溶性エラスチンの疎水性相互作用を変化させることで、直接凝集能を制御する事が出来るのではないかと予想される、本実験では水溶性エラスチン水溶液に、蛋白質同士の疎水性相互作用を強める溶媒トリフルオロエタノール(TFE)と、疎水性相互作用を破壊する尿素を添加し、水溶性エラスチン分子間の疎水性相互作用の強度を変化させ、凝集における疎水性相互作用の役割を推察した。

[試薬・器具・機器]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ 2,2,2-トリフルオロエタノール(Wako)
- ・ 尿素(Wako)
- ・ フォトメーター(Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー(Uniphase)
- ・ 恒温槽(和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル
- ・ ねじ口試験管(マルエム)

[方法]

- ① TFE を 1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%(v/v)、尿素を 0.5M、1.0M、2.0M、3.0M、4.0M、5.0M、6.0M の水溶液に調整した。
- ② ねじ口試験管で、水溶性エラスチンが濃度 1%(v/v)になるようにそれぞれの水溶液を加え調整した。
- ③ 溶液 2ml をディスポセルに移し、透過光測定装置にセットした。
- ④ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1℃ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

[結果]

- ・ TFE の 20%～50%は 10℃以下で凝集してしまった為、透過光強度測定できなかった。
- ・ TFE の濃度が上昇すると、凝集温度は低下した。(図.3-1-3-3)

- ・ 尿素は 3.0～6.0M では、80℃以下で凝集しなかった。また 0.5M から 2.0M までの間では尿素的濃度が上昇するに従って、凝集温度が上昇した。
(図.3-1-3-4)

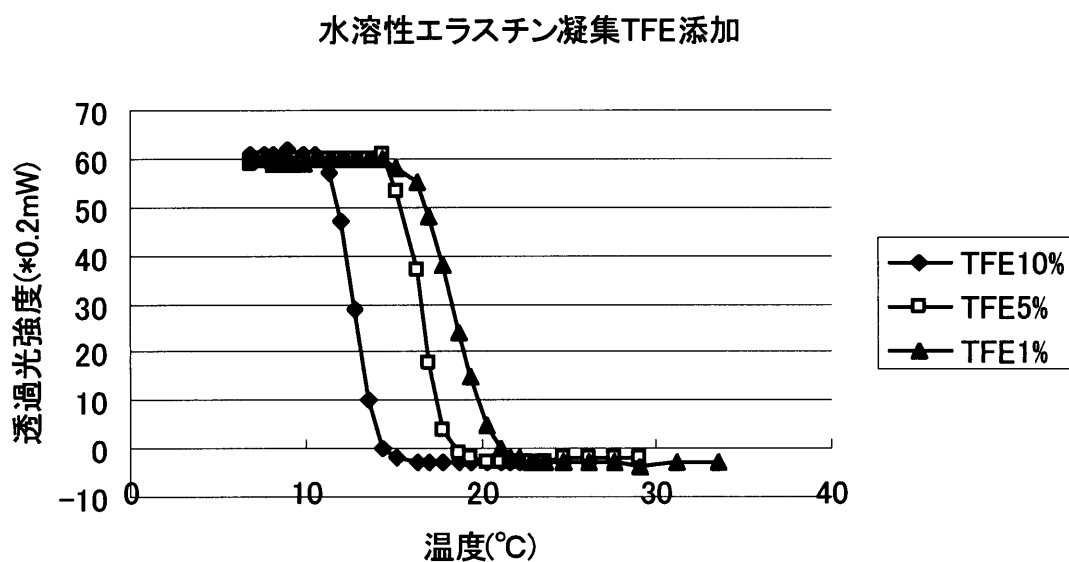


図.3-1-3-1 TFE 濃度と透過光強度

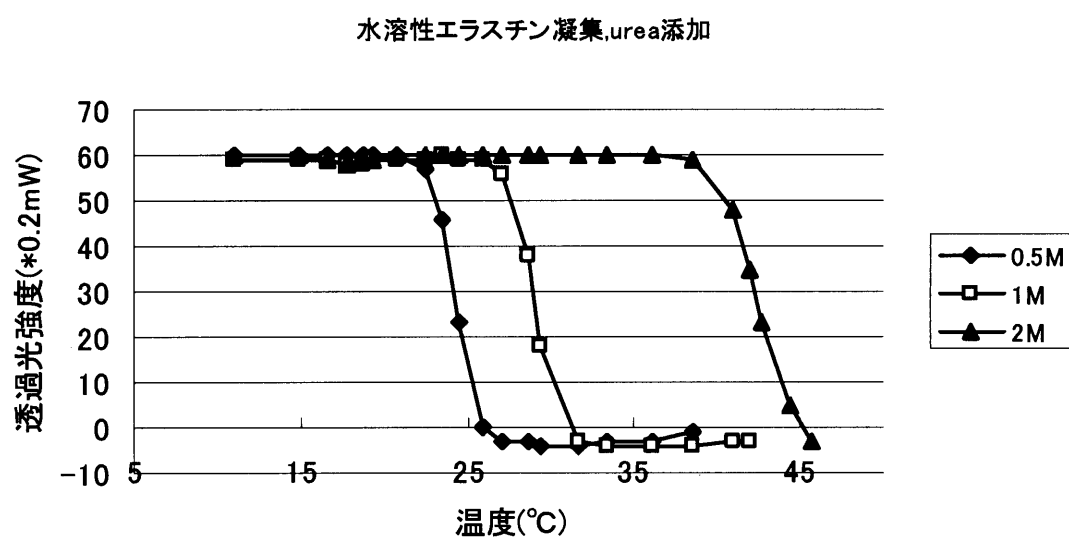


図.3-1-3-2 尿素濃度と透過光強度

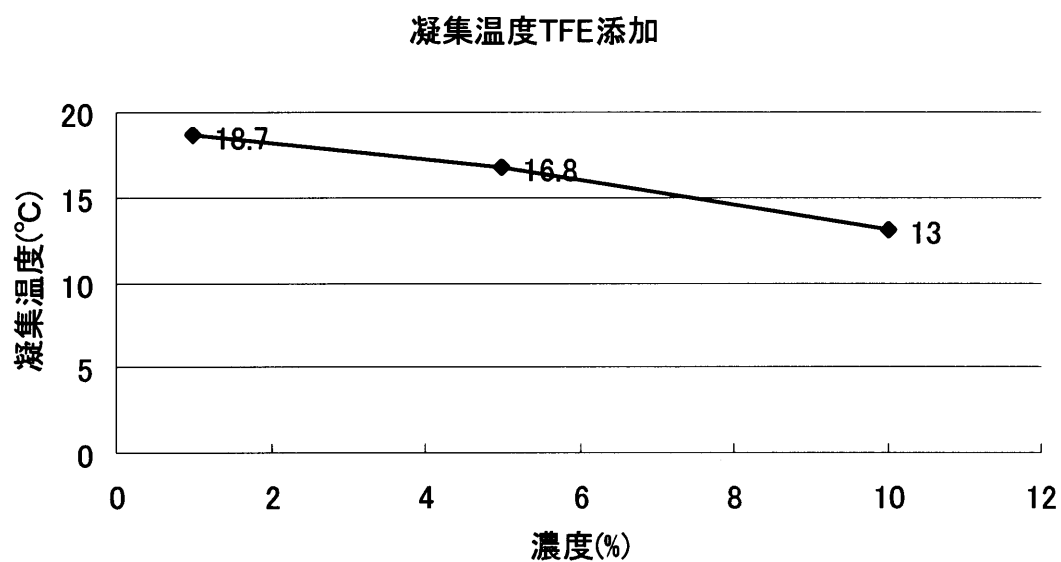


図.3-1-3-3 TFE 濃度と凝集温度

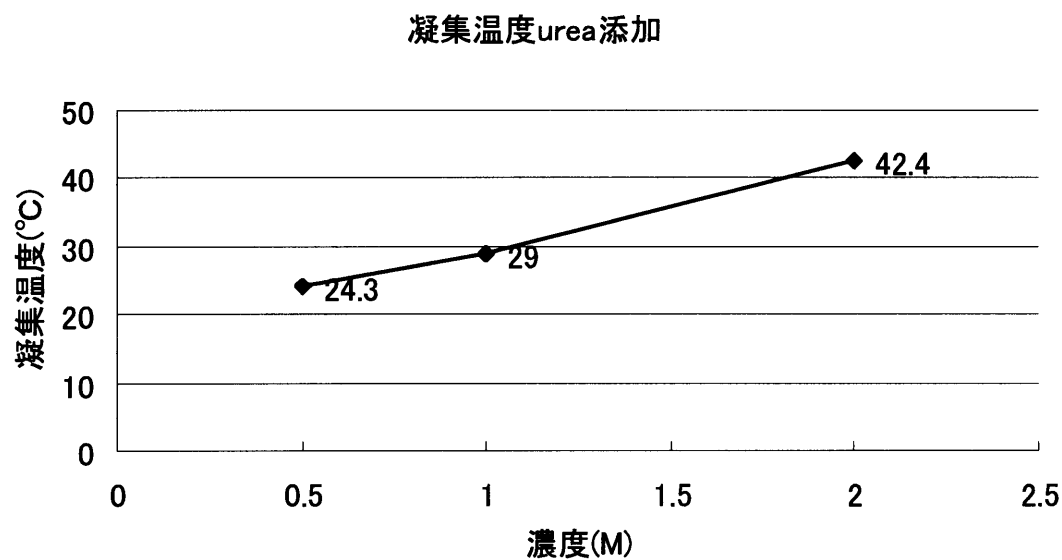


図.3-1-3-4 尿素濃度と凝集温度

[考察]

TFE によって凝集温度が低下したのは TFE がミセル状の集合体を形成し、それが水溶性エラスチンの疎水性相互作用を強化し、水溶性エラスチンの凝集温度を低くしたのではないかと考えられる。

通常タンパク質は疎水性相互作用によって疎水基同士が集まり、さらに水素結合を形成して構造を保っている。ここに尿素が存在するとタンパク質同士で水素結合せずに尿素と水素結合しても同様に安定な為、その構造が破壊されることが知られている。即ち尿素添加の際の凝集性の低下は、水溶性エラスチンが疎水性相互作用によって会合し、水素結合を形成するべきものを阻害されたことで生じた現象であることが考えられる。

3-1-4 糖による影響

【目的】

糖は細胞外マトリックス中に含まれ、糖鎖認識による細胞との特異的な結合や、硫酸基やカルボキシル基の負電荷により水を大量に水和させ、それによって生じる膨潤圧に起因する圧に対する抵抗力などを担っている。

またグルコースなどの単糖は水の構造化を起こし、水の熱運動を緩和する性質を持っている。その効果が、水溶性エラスチンの凝集にどのような影響を与えるかを検討した。

【試薬・器具・機器】

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ D(+)-グルコース(Wako)
- ・ トレハロース、Endotoxin Free(HAYASHIBARA BIOCHEMICAL LABORATORIES, INC)
- ・ D-グルクロン酸(SIGMA)
- ・ D-グルコサミン (Wako)
- ・ ヒアルロン酸
- ・ カルボキシルメチル化ジェラン(カルボキシルメチル化度 100%)
- ・ 硫酸化ジェラン(硫酸化度 50%)
- ・ ヘパリン (SPL)
- ・ フォトメーター (Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー (Uniphase)
- ・ 恒温槽 (和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル
- ・ ねじ口試験管(マルエム)

【方法】

- ① D(+)-グルコース、トレハロースをそれぞれ 0.0001、0.001、0.01、0.1、0.5、1.0、2.0M に調整し、D-グルクロン酸、D-グルコサミン、ヒアルロン酸、カルボキシルメチル Gelan、硫酸化 Gelan、ヘパリンを水溶性エラスチンに対し 5%(v/v)になるように調整した。
- ② ねじ口試験管で、水溶性エラスチンが濃度 1%(v/v)になるようにそれぞれの

水溶液を加え調整した。

- ③ 溶液 2ml をディスポセルに移し変え透過光測定装置にセットした。
- ④ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1℃ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

【結果】

- ・ D(+)-グルコースの 1.0、2.0M、トレハロースの 2.0M は、水溶性エラスチンが溶解しなかった。
- ・ D(+)-グルコース、トレハロースどちらも濃度が 0.1M を超えると、凝集温度が低下している(図.3-1-4-3)。また糖添加における効果として、カルボキシ基や硫酸基を持つ糖の方がより水溶性エラスチンの凝集を阻害している。
- ・ ジェランのヒドロキシ基を置換したカルボキシメチルジェランと硫酸化ジェランを比べると、硫酸化ジェランの方が、より凝集温度が高い(図.3-1-4-5)
- ・ ヘパリンは 80℃を超えても凝集しなかったため凝集温度を測定できなかった。(図.3-1-4-5)

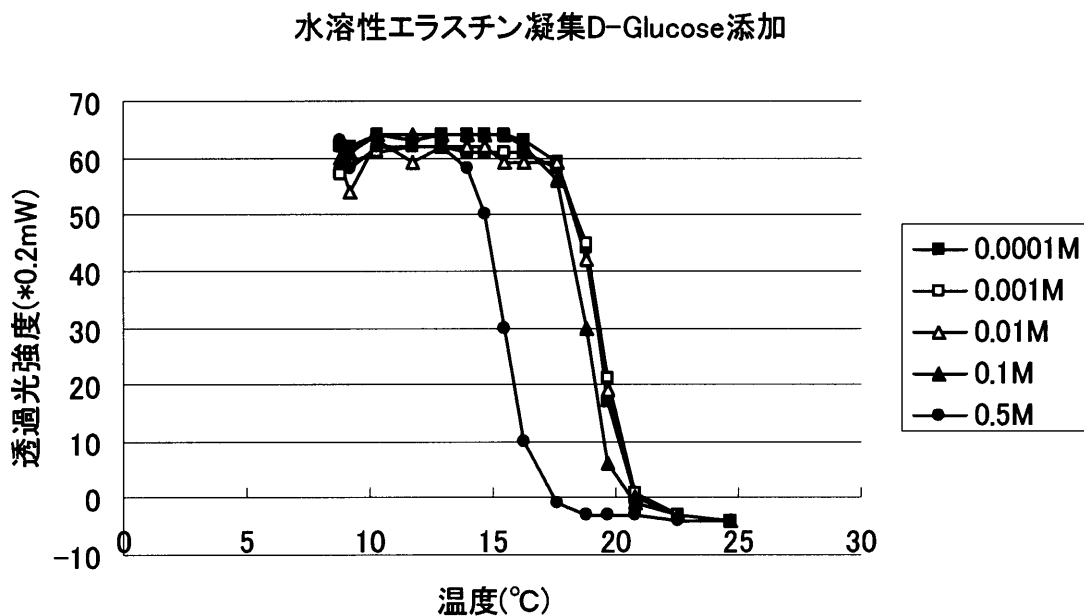


図.3-1-4-1 水溶性エラスチンに D-グルコースを添加した時の透過光強度

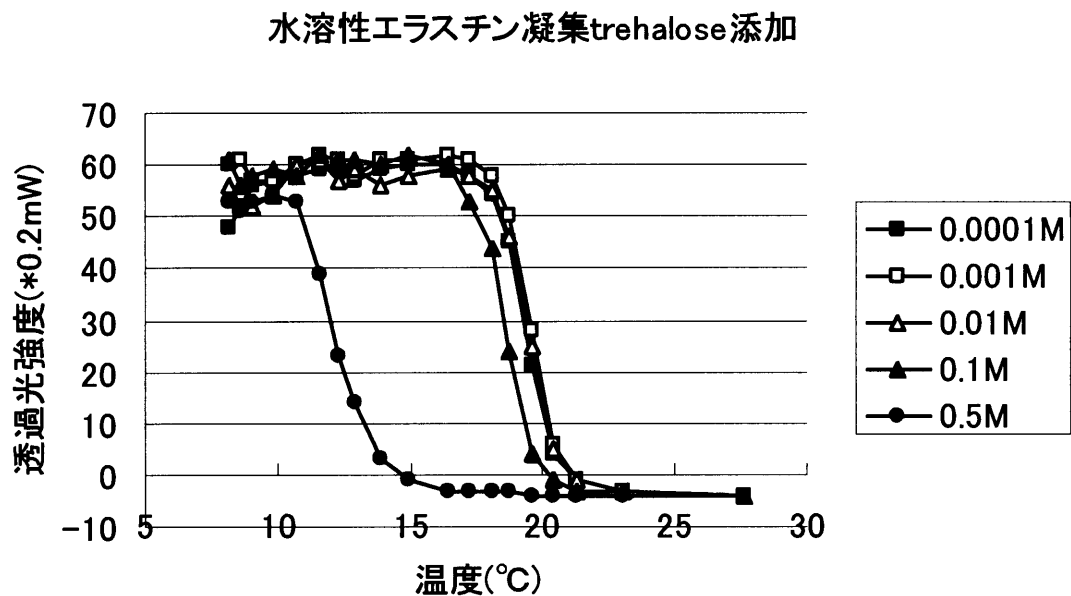


図.3-1-4-2 水溶性エラスチンにトレハロースを添加した時の透過光強度

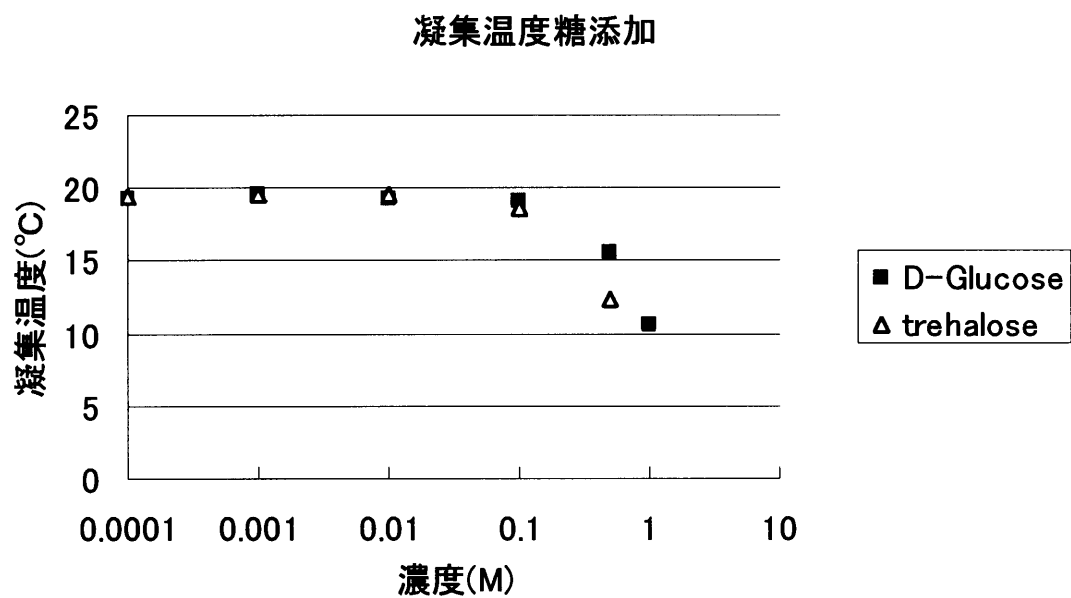


図.3-1-4-3 水溶性エラスチンに D-グルコース、トレハロースを添加した時の凝集温度

水溶性エラスチン凝集糖添加

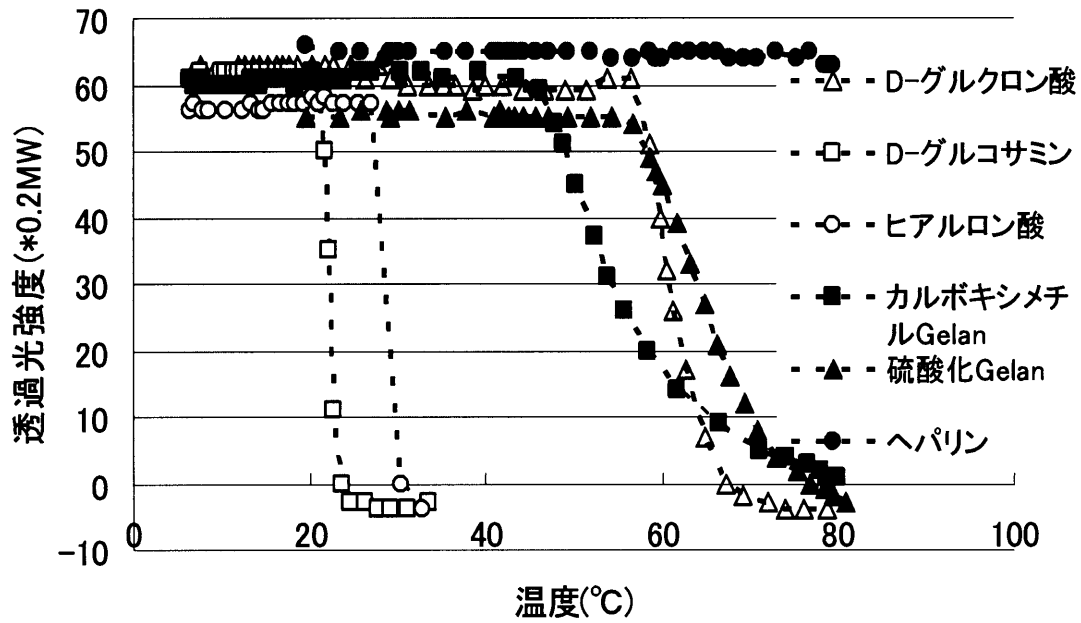


図.3-1-4-4 水溶性エラスチンに糖を添加した時の透過光強度

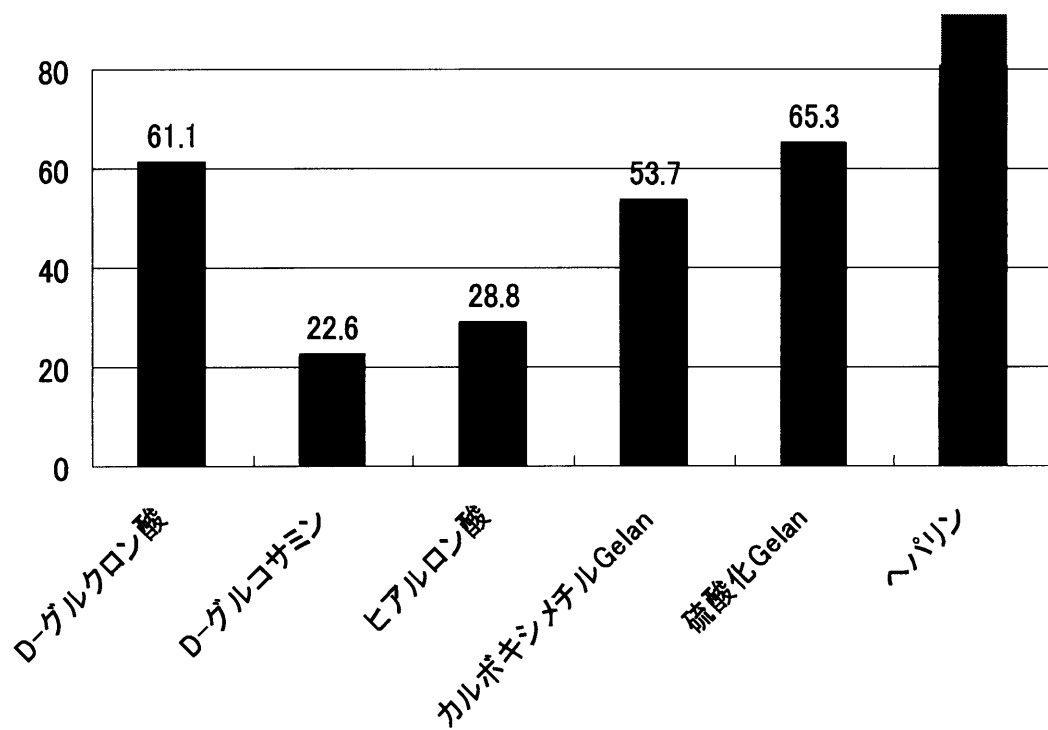


図.3-1-4-5 水溶性エラスチンに糖を添加した時の凝集温度

[考察]

D(+)-グルコース、トレハロースの凝集温度低下(図.3-1-4-3)は、多量の糖によって水の溶解度が低下した為であると考えられる。また、カルボキシル基や硫酸基を持った糖が凝集温度を上昇させているのは、それらの側鎖が水溶性エラスチンの酸性アミノ酸に結合し、水溶性エラスチン分子同士の会合を阻害したためではないかと考えられる。

また、カルボキシル基を持つヒアルロン酸は D-グルクロン酸に比べ凝集温度が低い、ヒアルロン酸は分子におけるカルボキシル基の割合が、D-グルクロン酸に比べ少ないことが理由と考えられる。(図.3-1-4-5)

3-1-5 種々の架橋剤による影響

[目的]

水溶性エラスチンを用いて、生体材料としての人工マトリックスを作成する際、架橋剤を用いてゲル化を行う。そこで、種々の架橋剤による水溶性エラスチンへの作用を、架橋剤を添加した水溶性エラスチンの凝集反応を観察することで、推測した。また炭素鎖長の異なる架橋剤を用いることによって、エラスチン分子と架橋剤との疎水性相互作用の効果も評価した。

[試薬・器具・機器]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ Dode-DSP (Dodecanedicarboxylic acid-DSP)
- ・ Seb-DSP (Sebacic acid-DSP)
- ・ Adi-DSP (Adipic acid-DSP)
- ・ Tere-DSP (Terephthalic acid-DSP)
- ・ フォトメーター(Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー(Uniphase)
- ・ 恒温槽(和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル
- ・ ねじ口試験管(マルエム)

[方法]

- ① ねじ口試験管で、Dode-DSP、Seb-DSP、Adi-DSP、Tere-DSP を水溶性エラスチンのリシン残基との仕込み比が、 $\times 0.5$ 、 1.0 、 2.0 、 5.0 、 10.0 、そして水溶性エラスチンの濃度 $1\%(v/v)$ になるようにそれぞれの水溶液を加え調整した。
- ② 溶液 2ml をディスポセルに移し、透過光測定装置にセットした。
- ③ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1°C ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。

[結果]

- ・ Dode-DSP、Seb-DSP、Adi-DSP、Tere-DSP どの架橋剤を加えても、濃度依存的に凝集温度が上昇したが、Adi-DSP、Tere-DSP が仕込み比 $\times 10.0$ で凝集温度が 28.2°C 、 30.5°C と架橋剤を加えていない場合と比べて、約 10°C 程度しか上昇していないのに比べ、Dode-DSP、Seb-DSP では約 40°C 上昇した。

- Seb-DSP の仕込み比×5、×10 は最初水に溶解していなかったのに透過光強度が低いが、温度上昇に伴い溶解し透過光強度が上昇している。

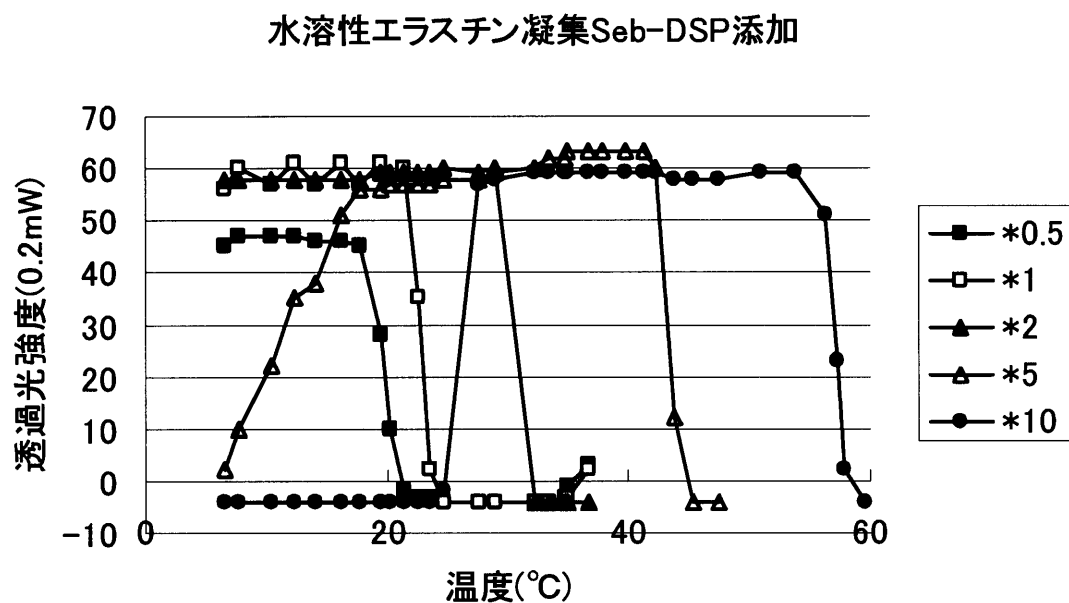


図.3-1-5-1 水溶性エラスチンに Seb-DSP を添加した時の透過光強度

水溶性エラスチン凝集Adi-DSP添加

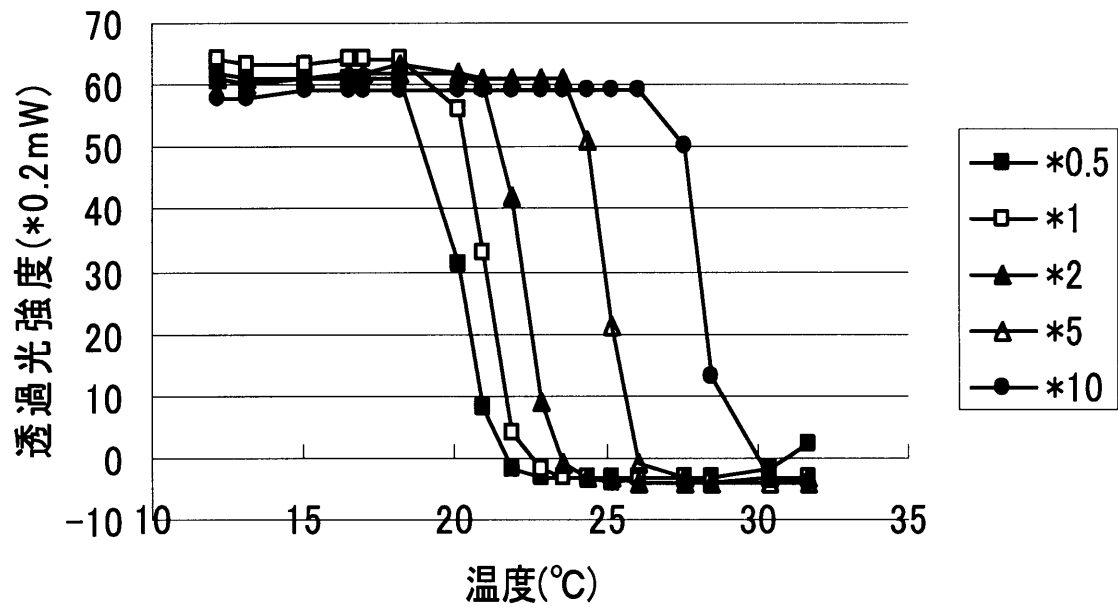


図.3-1-5-2 水溶性エラスチンに Adi-DSP を添加した時の透過光強度

水溶性エラスチン凝集温度Tere-DSP添加

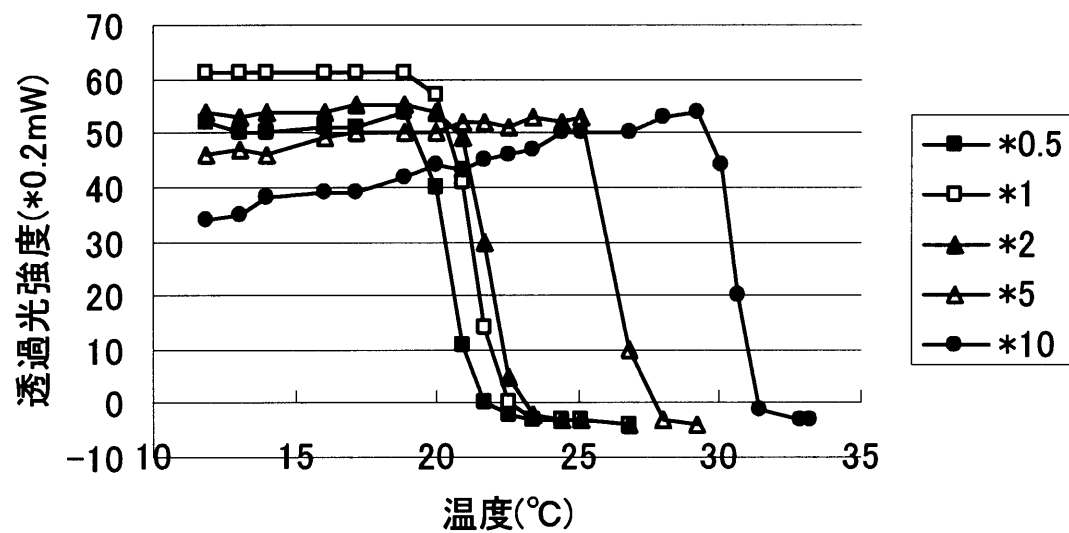


図.3-1-5-3 水溶性エラスチンに Tere-DSP を添加した時の透過光強度

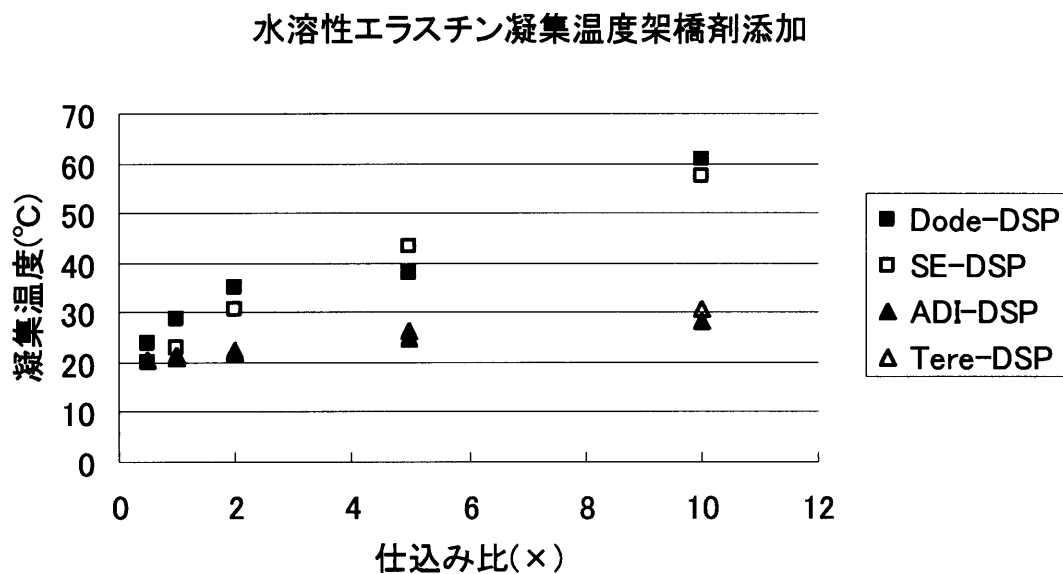


図.3-1-5-4 水溶性エラスチンに Tere-DSP を添加した時の透過光強度

[考察]

凝集温度を見ると(図.3-2-5-4)架橋剤の炭素鎖の長さにしたがって、段々凝集温度が上がるのではなくて、Dode-DSP、Seb-DSP と Adi-DSP、Tere-DSP の2グループに分かれている。つまり、炭素鎖長が長くなり、ある点を越えると水溶性エラスチンの凝集温度に強い影響を及ぼすのではないかと考えられる。

4章 エラスチンマトリックス

目的

表 1-1-1 で示したように、生体組織はそれぞれの組織で、また同じ組織でも部位によってそれぞれ必要に応じた最適な物理特性を保持している。例えば血管では、同じ動脈であっても、部位によってかなり弾性率に差がある。(表 4-1-1)

表 4-1-1 各部血管の弾性率

部位	弾性率 E(MPa)
腹大動脈	5.6
総頸動脈	5.3
大腿動脈	19.8
冠動脈	29.8

従って、人工細胞外マトリックスを作成する場合も、様々な物理力学を持つものに制御可能であることが望まれる。そこで本章では 3 章での凝集温度と相互作用で得られた知見を利用して、エラスチンの溶液中での外部条件を調節して、エラスチンゲルを作成することで、その力学特性がどのように関連するかを検討した。

4-1 方法

4-1-1 エラスチンハイドロゲルの作成

[試薬・器具・機器]

水溶性エラスチン

Dode-DSP

ミリQ水

15ml 遠沈管(ono)

キャピラリーチューブ(内径 1.0mm 外形 1.55mm) (Flon Industry)

シリコンチューブ(AS ONE)

1.0ml シリンジ(TERUMO)

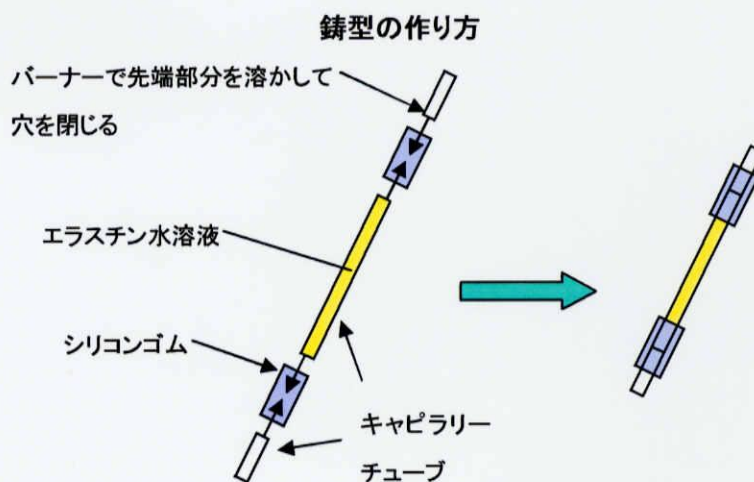
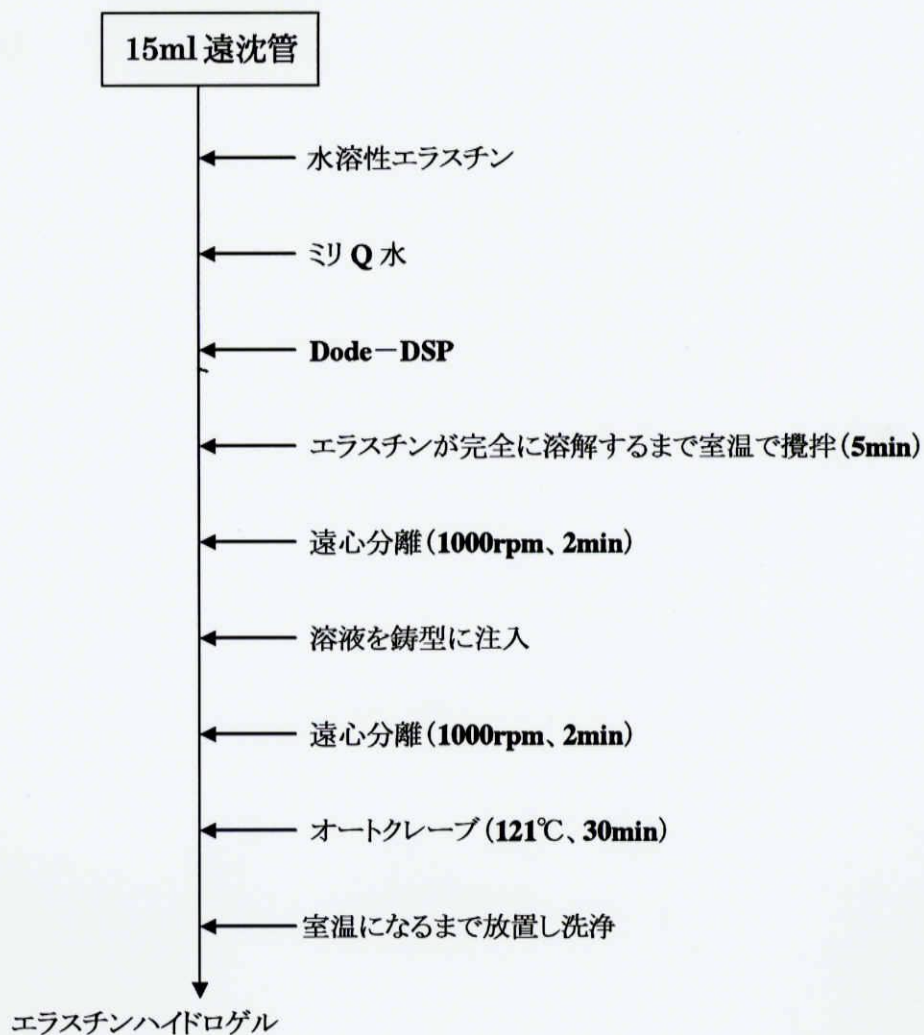
遠心分離機 CT-6D(HITACHI)

オートクレーブ IST-150(Pasolina)

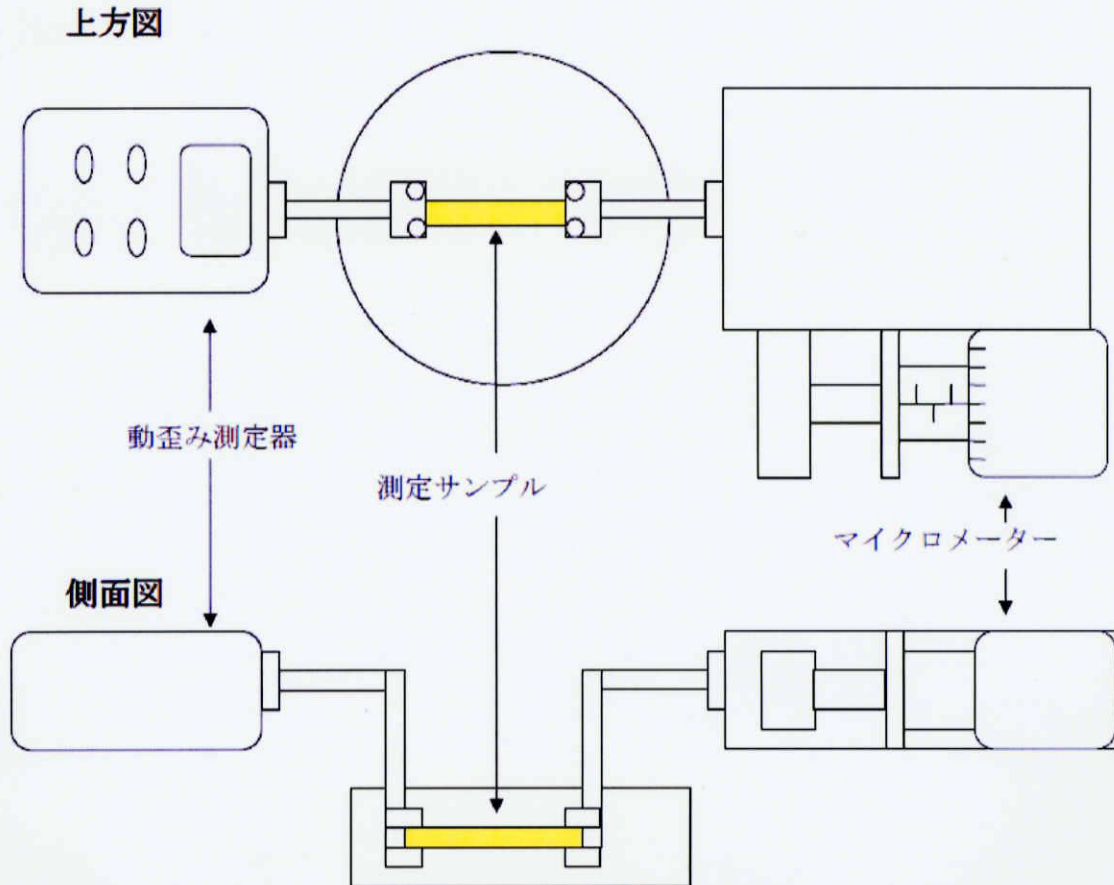
[方法]

- ① 不溶性エラスチンから調整した水溶性エラスチンを使用して、設定した濃度(10%、20%、30%、40%など)のエラスチン水溶液になるようにエラスチンをとり、ミリQ水と架橋剤として Dode-DSP をエラスチンのアミノ基に対して倍数量(0.25 倍、0.5 倍、1.0倍、2.0 倍など)加えた。
- ② ガラス棒で混合攪拌し完全に溶解させた後、遠心分離 (1000rpm、2min)して、脱気を行った。
- ③ 脱気したエラスチン水溶液を、キャピラリーに詰めて栓をして再び遠心分離 (1000rpm、2min)して脱気を行った。
- ④ エラスチン水溶液の入ったキャピラリーを蒸留水で満たされた試験管に入れて栓をして密封し、オートクレーブ(121℃、30min)で加熱した。
- ⑤ 加熱後、室温になるまで冷却し、エラスチンハイドロゲルを取り出し、蒸留水で洗浄した。

＜エラスチンハイドロゲル作成 フローチャート＞



4-1-2 弾性率及び伸張率の測定



上記の装置を使用し、一秒間に0.5mmずつゲルを引っ張り、ひずみと応力そしてゲルが破断するまでのゲルの長さを測定し以下の式を用いて解析した。

$$\text{弾性率 (Pa)} = (F/A) / \{(I-I_0)/I\} \text{ --- ①}$$

$$\text{伸長率 (\%)} = (I_{\text{MAX}} - I_0) / I_0 \text{ --- ②}$$

F: 応力 (N) A: 断面積 (m²) I₀: 自然長 (m) I: ゲルの長さ (m)

4-2 添加物による変化

4-2-1 架橋剤による変化

[目的]

水溶性エラスチンを用いて、生体材料としての人工マトリックスを作成する際、架橋剤を用いてゲル化を行う。そこで、架橋剤の種類および濃度を変化させることにより作成したゲルの力学特性を調べることを目的とした。

[試薬]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ Dode-DSP (Dodecanedicarboxylic acid-DSP)
- ・ Seb-DSP (Sebacic acid-DSP)
- ・ Adi-DSP (Adipic acid-DSP)
- ・ Tere-DSP (Terephthalic acid-DSP)
- ・ エチレングリコールジグリシジルエーテル (EG)

[方法、条件]

- ① 不溶性エラスチンから調整した水溶性エラスチンを使用して、**30%**のエラスチン水溶液になるように水溶性エラスチンをとり、ミリ Q 水と架橋剤として **Dode-DSP**、**Seb-DSP**、**Adi-DSP**、**Tere-DSP** および **EG** をエラスチンのアミノ基に対してそれぞれ **0.5 倍**、**1.0 倍**、**2.0 倍**、**3.0 倍**、**5.0 倍**、**6.0 倍**、**8.0 倍**量加えた。
- ② ガラス棒で混合攪拌し完全に溶解させた後、遠心分離 (**1000rpm**、**2min**)して、脱気を行った。
- ③ 脱気したエラスチン水溶液を、キャピラリーに詰めて栓をして再び遠心分離 (**1000rpm**、**2min**)して脱気を行った。
- ④ エラスチン水溶液の入ったキャピラリーを蒸留水で満たされた試験管に入れて栓をして密封し、オートクレーブ (**121℃**、**30min**)で加熱した。
- ⑤ 加熱後、室温になるまで冷却し、エラスチンハイドロゲルを取り出し、蒸留水で洗浄した。
- ⑥ 弾性率及び、伸長率を測定した。

[結果]

- ・ DSP 系架橋剤ではエラスチンのアミノ基に対する仕込み比率を上げると、ゲルの弾性率は増加するが、ある比率を超えると逆に低下することがわかった。

- ・ EG 系架橋剤では、弾仕込み比率が上がると弾性率が増加し、DSP 系架橋剤のような低下する減少は見られない。
- ・ EG 系架橋剤では、弾性率の増加に伴って伸張率は低下する現象が見られた
- ・ DSP 架橋剤では、EG 架橋剤のような弾性率と伸張率の関係は見られず、架橋剤の仕込み比率が増加するに伴って、伸張率も増加する傾向が見られた。

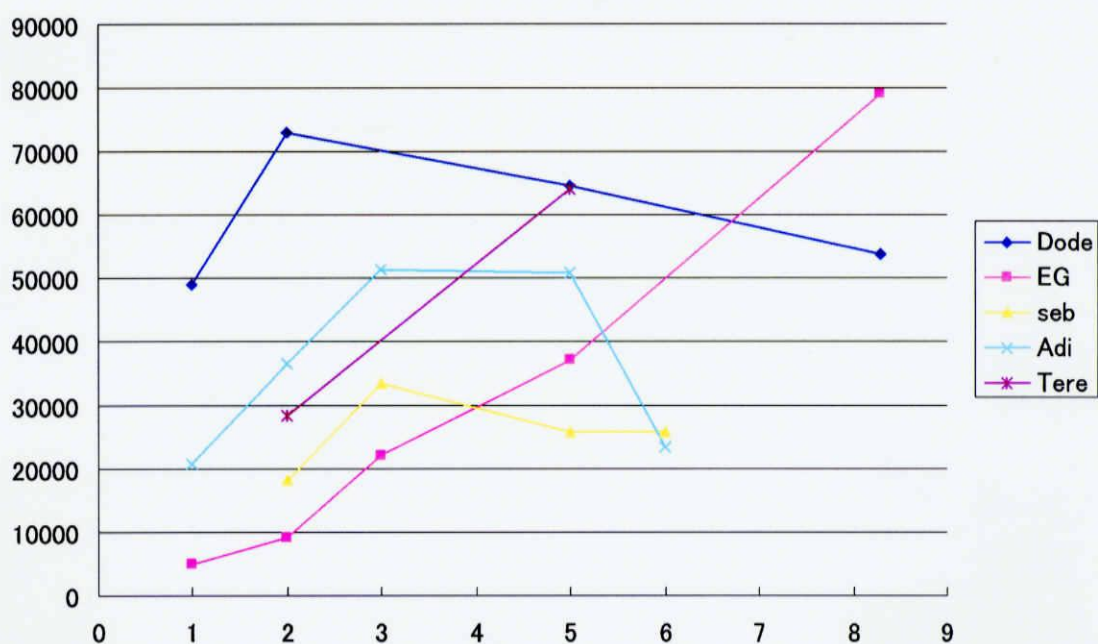


図 4-2-1-1 種々の架橋剤仕込み倍率に対するエラスチンゲルの弾性率変化
(縦軸：弾性率 (Pa)、横軸：架橋剤倍率 (対エラスチン中のアミノ基モル数))

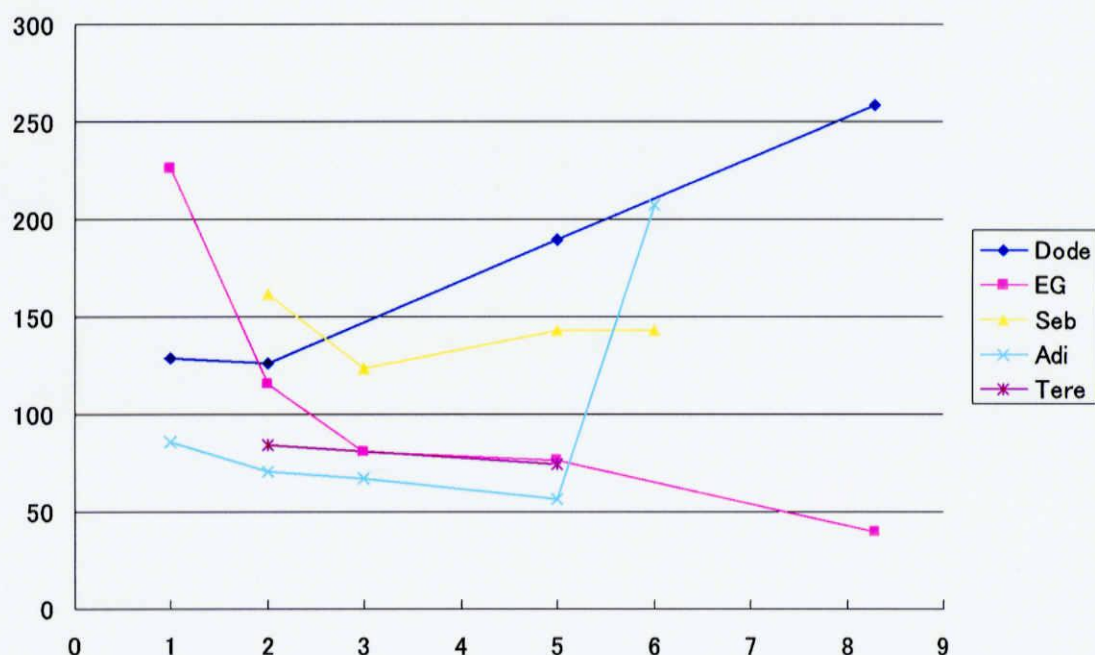


図 4-2-1-2 種々の架橋剤仕込み倍率に対するエラスチンゲルの伸張率変化
(縦軸：伸張率 (%))、横軸：架橋剤倍率 (対エラスチン中のアミノ基モル数)

[考察]

DSP 系架橋剤とは、架橋領域がアルキル鎖で疎水性が高いことが特徴の架橋剤である。そのため通常は水不溶性ではあるが DSP 基により水和させ、架橋反応後は DSP 基をはずす原理で架橋できる (活性エステル法)。

凝集温度の変化からも、エラスチンとの相互作用が強く、特にエラスチン分子中の疎水性基との反応が大きいことが予想される結果を得ている。即ち、エラスチン分子内での凝集構造としては架橋剤が、エラスチンの疎水性部分に不均一的に凝集し架橋するものと思われる。そうした架橋構造が、ゲルの強度を低下させるものの、伸張性を増加させているものと考えられる。

EG 系架橋剤は、逆に架橋領域が水酸基を有する親水性架橋剤であり、エラスチンとの相互作用は弱いため、均一に分散し架橋構造を形成するものと考えられる。そこで、仕込み比率が増加すると架橋密度が高まり、弾性率が増加し伸張性が失われるものと考えられる。

4-2-2 イオンの影響

[目的]

3章でイオン添加における凝集温度変化を示した。それら凝集能への影響がゲル物理強度にどのような影響を与えるか、また凝集温度とゲル強度の比較からイオン添加によって水溶性エラスチンの状態がどのように変化しているのかを予測する

[試薬]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ 塩化ナトリウム (Wako)
- ・ 塩化カルシウム (Wako)
- ・ 塩化アルミニウム (Wako)
- ・ 塩化鉄(III) 六水和物(Wako)

[方法、条件]

- ① 30%のエラスチン水溶液になるように水溶性エラスチンをとり、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、塩化アルミニウム、塩化鉄(III) 六水和物それぞれを 0.005、0.01、0.1、0.5、1.0、2.0M に調整し加え、架橋剤として Dode-DSP をエラスチンのアミノ基に対して 2.0 倍量加えた。
- ② ガラス棒で混合攪拌し完全に溶解させた後、遠心分離 (1000rpm、2min)して、脱気を行った。
- ③ 脱気したエラスチン水溶液を、キャピラリーに詰めて栓をして再び遠心分離 (1000rpm、2min)して脱気を行った。
- ④ エラスチン水溶液の入ったキャピラリーを蒸留水で満たされた試験管に入れて栓をして密封し、オートクレーブ (121℃、30min) で加熱した。
- ⑤ 加熱後、室温になるまで冷却し、エラスチンハイドロゲルを取り出し、蒸留水で洗浄した。
- ⑥ 弾性率及び、伸長率を測定した。

[結果]

- ・ 塩化アルミニウムは、2M 以上で水溶性エラスチンが溶解しなかった。塩化鉄(III) 六水和物は 2M で水溶性エラスチンが溶解しなかった。
- ・ 1 価、2 価のカチオンを加えた時では、弾性率はほとんど変化がなく、伸長率はカチオン濃度が上昇するに連れ上昇した。一方 3 価のカチオンでは、塩化アルミニウムの場合、弾性率では 1M で測定不能なほど高くなり、伸長率

では 0.5M で 1,2 価の約 3 倍伸びるようになっている。また塩化鉄(III) 六水和物では、低濃度で極端に弾性率が上昇し、1M まで高濃度になると低下していく、伸長率にも同様の傾向がみられる。

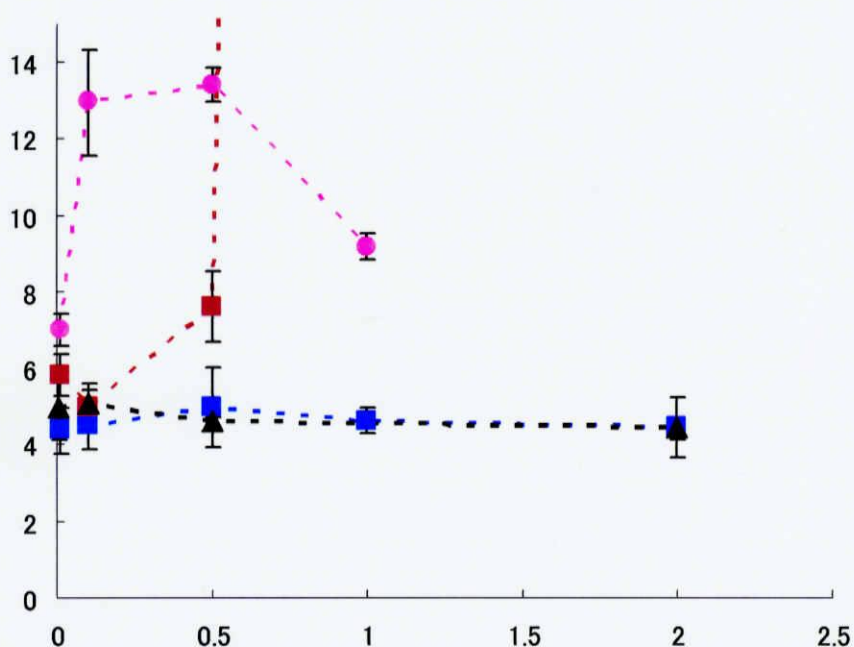


図 4-2-2-1 添加塩濃度に対するエラスチンゲルの弾性率変化

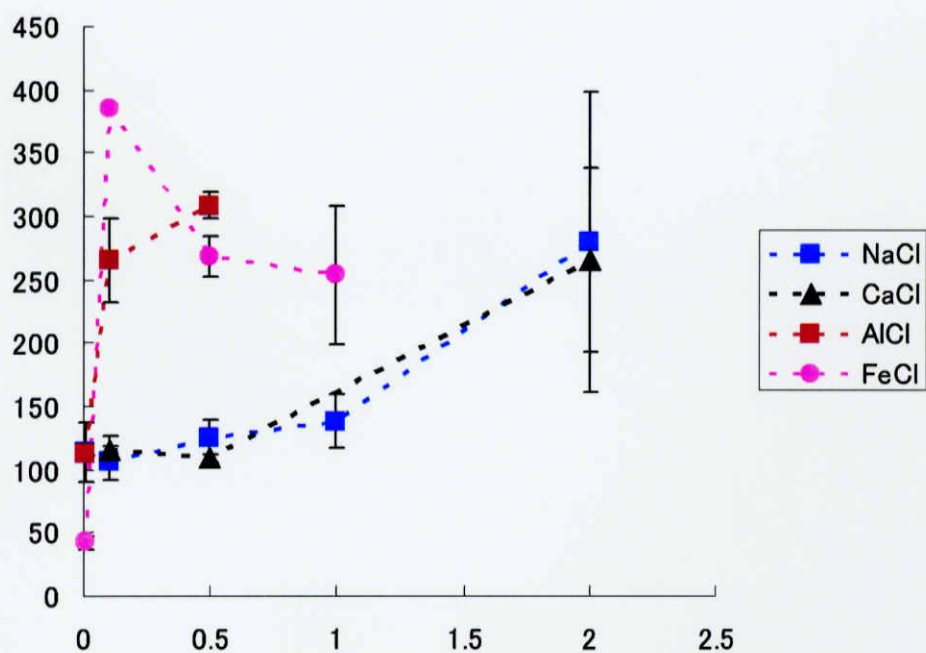


図 4-2-2-2 添加塩濃度に対するエラスチンゲルの弾性率変化

【考察】

1 価、2 価のカチオンを加えた場合では、弾性率に関しては変化が見られず、伸長率はカチオン濃度上昇に伴って大きくなった。これはカチオンが添加され、凝集能が弱められた水溶性エラスチンの分子同士が乱雑な状態で架橋が起こる為、弾性率が変わらずに伸長率が上がるのではないかと考えられる。

また 3 価のカチオンの場合では、1 価および 2 価の結果とは、大きく異なる挙動を示した。低濃度でかなり弾性率が上昇しているが、これは 3 価のカチオンによってキレーションが引き起こされる為ではないかと考えられる。また弾性率が上昇しているにも関わらず、伸長率が伸びているのは、化学架橋に比べて弱いキレーションが引っ張ることで切断され、移動したところで再びキレートを形成する為ではないかと思われる。

4-2-3 疎水性相互作用

[目的]

3章で尿素と TFE 添加における凝集温度変化を示した。それら凝集能への影響がゲル物理強度にどのような影響を与えるか、また凝集温度とゲル強度の比較から尿素と TFE 添加によって水溶性エラスチンの状態がどのように変化しているかを予測する

[試薬]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ 尿素(Wako)
- ・ 2,2,2-トリフルオロエタノール(Wako)

[方法、条件]

- ① 30%のエラスチン水溶液になるように水溶性エラスチンを取り、尿素、TFE をそれぞれ 0.5M、1.0M、2.0M、3.0M そして 1%、5%、10%、20%になるように調整し加え、架橋剤として Dode-DSP をエラスチンのアミノ基に対して 2.0 倍量加えた。
- ② ガラス棒で混合攪拌し完全に溶解させた後、遠心分離 (1000rpm、2min)して、脱気を行った。
- ③ 脱気したエラスチン水溶液を、キャピラリーに詰めて栓をして再び遠心分離 (1000rpm、2min)して脱気を行った。
- ④ エラスチン水溶液の入ったキャピラリーを蒸留水で満たされた試験管に入れて栓をして密封し、オートクレーブ (121℃、30min)で加熱した。
- ⑤ 加熱後、室温になるまで冷却し、エラスチンハイドロゲルを取り出し、蒸留水で洗浄した。
- ⑥ 弾性率及び、伸長率を測定した。

[結果]

- ・ 尿素は 1.0M 以上でゲルが膨潤して脆くなってしまい測定できなかった

表.4-2-3-1 ゲルに尿素添加した時の弾性率と伸長率

尿素 0.5M	弾性率(Pa)	伸長率(%)
	45356	60
	47477	51

平均	46416.5	55.5
標準偏差	1499.8	6.4

- ・ TFE 添加によるゲル化に関しては、添加濃度の比率が増加すると、弾性率が低下し、逆に伸張率が増加した。
- ・ 伸張性に関しては 250 % 程度と変形性が大きい、ゲル強度の低下は 2 万 Pa と小さい

エラスチンゲル弾性率、TFE添加

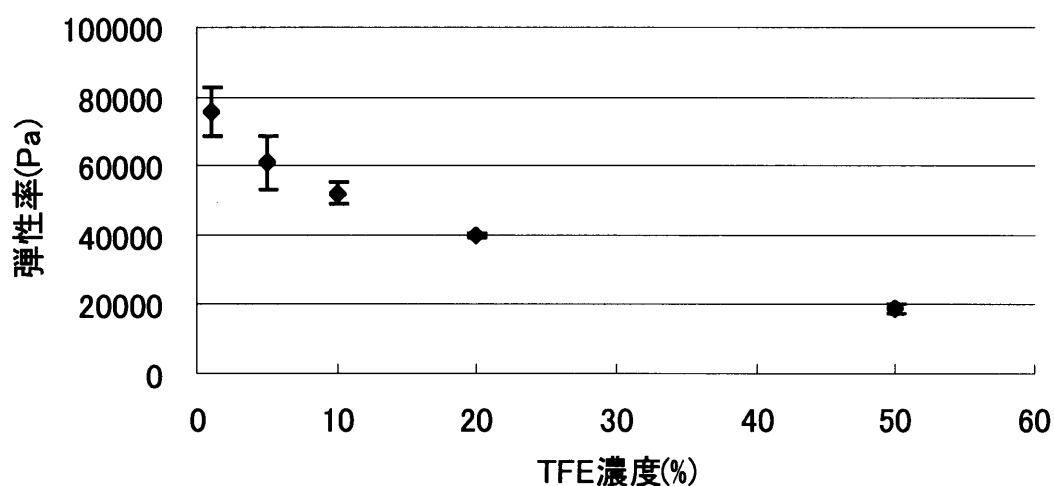


図.4-2-3-1 TFE を加えた時のゲル弾性率

エラスチンゲル伸長率、TFE添加

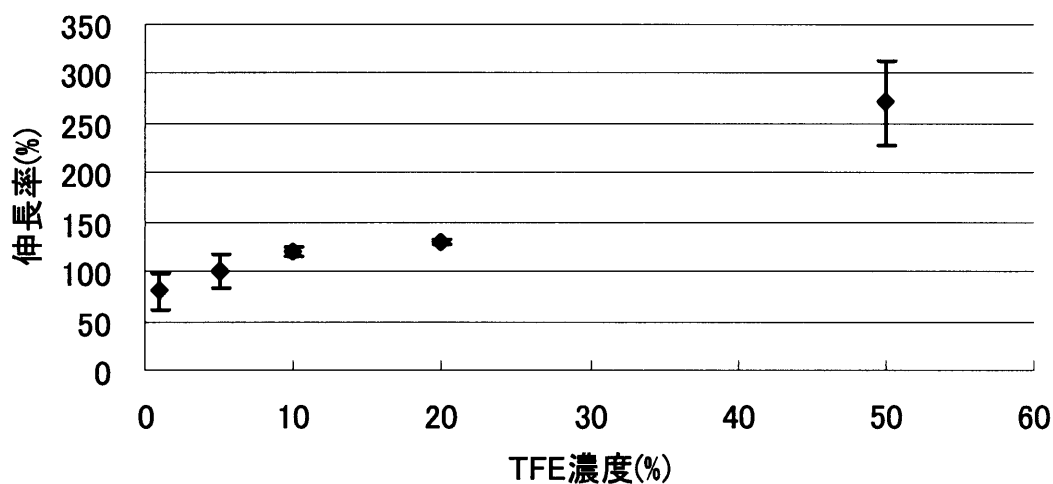


図.4-2-3-2 TFE を加えた時のゲル変形率

[考察]

通常タンパク質は疎水性相互作用によって疎水基同士が集まり、さらに水素結合を形成して構造を保っている。ところが尿素が存在するとタンパク質同士で水素結合せずに尿素と水素結合しても同様に安定な為、その構造が破壊されることが知られている。これが、水溶性エラスチンが疎水性相互作用によって会合し、水素結合を形成するべきものを阻害したと考えられる。その為、水溶性エラスチンの凝集能が弱くなり、また架橋領域が十分に会合せず、架橋を形成することが出来なかったため、脆いゲルが出来たのではないかと考えられる。

TEF 中では架橋反応が生じにくいことが予想れるため、疎水性相互作用によりエラスチン分子間の凝集挙動を変化させることで伸張性に効果を及ぼしたと思われる。

4-2-4 pH の影響

[目的]

3 章で pH 変化における凝集温度変化を示した。それら凝集能への影響がゲル物理強度にどのような影響を与えるか、また凝集温度とゲル強度の比較から pH 変化によって水溶性エラスチンの状態がどのように変化しているのかを予測する

[試薬]

- ・ 水溶性エラスチン(A)
- ・ 水酸化ナトリウム (Wako)
- ・ 塩酸 (Wako)

[方法、条件]

- ① 水酸化ナトリウム(0.001M)と塩酸(0.001M)を混合し、pH3.06、3.96、5.01、7.11、9.01、9.91、にそれぞれ調整した
- ② 水溶性エラスチンを、それぞれの pH に調整した溶液に架橋剤を加え 30%(v/v)のエラスチン水溶液になるように調整した。但し、架橋剤としてDode-DSPをエラスチンのアミノ基に対して 2.0 倍量加えた。
- ③ ガラス棒で混合攪拌し完全に溶解させた後、遠心分離 (1000rpm、2min)して、脱気を行った。
- ④ 脱気したエラスチン水溶液を、キャピラリーに詰めて栓をして再び遠心分離 (1000rpm、2min)して脱気を行った。
- ⑤ エラスチン水溶液の入ったキャピラリーを蒸留水で満たされた試験管に入れて栓をして密封し、オートクレーブ(121℃、30min)で加熱した。
- ⑥ 加熱後、室温になるまで冷却し、エラスチンハイドロゲルを取り出し、蒸留水で洗浄した。
- ⑦ 弾性率及び、伸長率を測定した。

[結果]

- ・ pH を変えてゲルを作成した場合は、その弾性率変化において凝集温度の結果と同様大きな差が見られない。
- ・ 伸張率変化では等電点近傍の条件下では、酸性およびアルカリ性の条件下で作成したゲルに比較して最大である

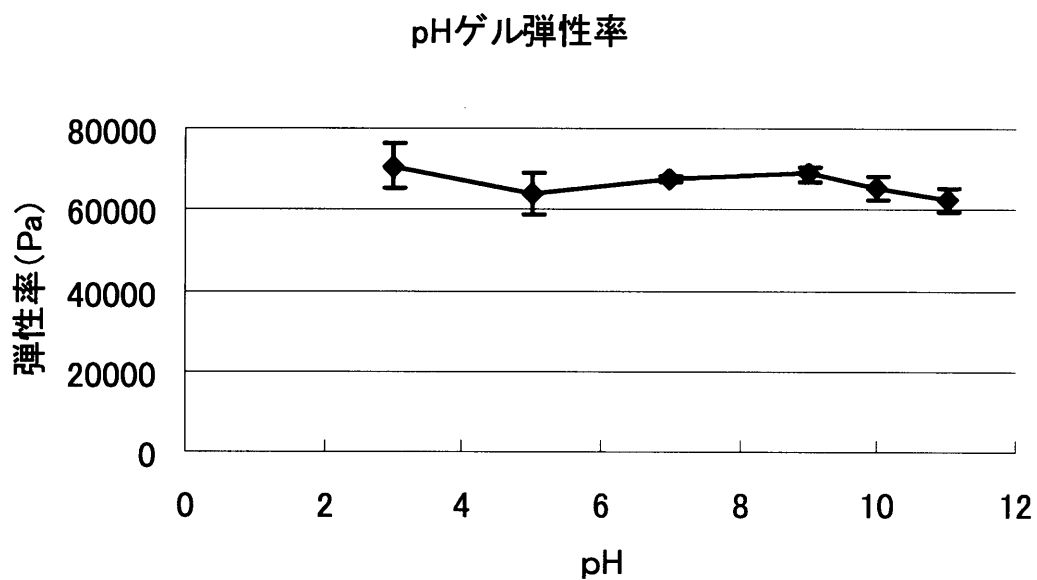


図.4-2-4-1 ゲル弾性率と pH 変化

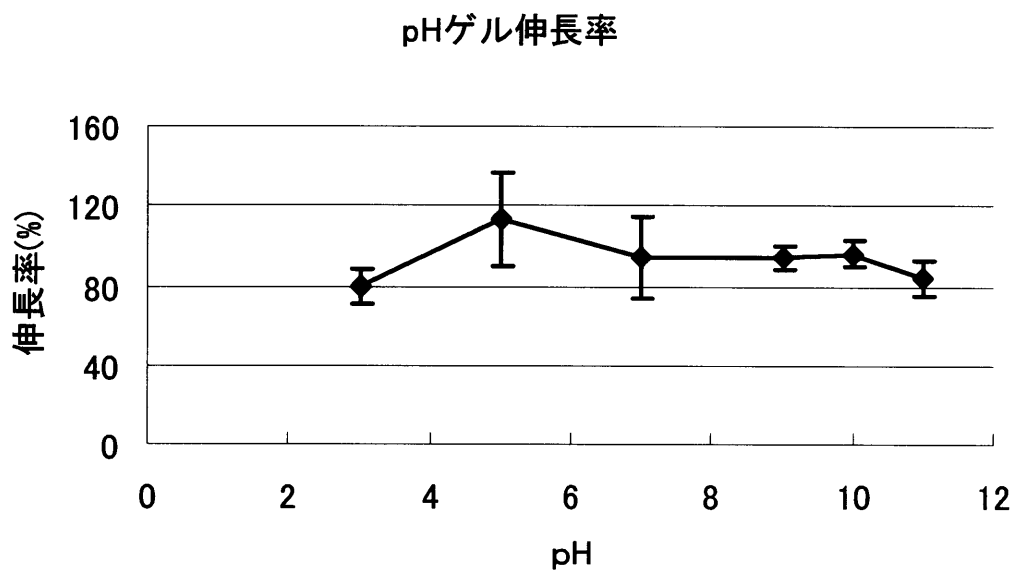


図.4-2-4-2 ゲル伸長率と pH 変化

[考察]

pH による変化は、最初の溶液作成の時点でエラスチンの解離状態を変化させることが可能と思われる。解離が多い条件下ではゲルの伸張性が損なわれ、脆いゲルになり、解離せずに凝集性が高まっている等電点近傍での高密度の凝集構造は、伸張性を高める効果をもたらしたと考えられる。

5 章 結論

1. ブタ血管から抽出したエラスチンを、シュウ酸加熱処理し、凝集温度、ゲル弾性率から分類することで、安定した性質の水溶性エラスチンを作成できた。

2.

凝集温度を測定することで、加える架橋剤や水溶性エラスチンの分子量、イオン添加などにおける作用を予測することができ、それはゲルの物理強度の予測を可能にする。このことは生体組織と同等の力学特性を構築する材料の設計に応用できると考えられる

参考文献

1 章

- 1) 宮本 啓一, 新 真樹ほか, 血管系細胞の細胞外基質認識性に関する研究
- 1) 宮本 啓一, 新 真樹ほか, 再生医療用エラスチンマトリックス材料の開発, 新技術フォーラム in みえ 2004, 11 / 9 (2004).
- 2) 宮本 啓一, 新 真樹ほか, 再生医療用エラスチンマトリックス材料の開発, フロンティア 21 エレクトロニクスショー2004, 産学交流テクノフロンティア 2004, 11 / 17~19 (2004).
- 3) 新 真樹, 宮本 啓一, 堀内 孝, 細胞外マトリックスの機能と細胞組織工学への応用, 第3回生活支援工学系学会連合大会予稿集, p 77 (2005).
- 4) 宮本 啓一, 新 真樹ほか, 血管壁組織構造を模倣した伸縮基材による平滑筋細胞の培養評価, 第43回日本人工臓器学会大会予稿集, s-153 (2005).
- 5) バイオ研究イラストマップ、佐々木 博己、羊土社 (2001).
- 7) 分子生物学講義中継〈Part2〉、井出 利憲、羊土社 (2004).
- 8) ビジュアル生化学・分子生物学、大塚 吉兵衛・安孫子 宜光、日本医事新報社 (2003).
- 9) 細胞骨格・運動がわかる、三木 裕明、羊土社 (2004).
- 10) 血管研究がわかる、高倉 伸幸、羊土社 (2004).
- 11) Essential 細胞生物学、中村 桂子・藤山 秋佐夫・松原 謙一、南江堂 (2003).
- 12) 新 細胞接着分子の世界、林 正男、羊土社 (2001).
- 13) 再生医療の実際、田畑 泰彦、羊土社 (2003).
- 14) 再生医療 ティッシュエンジニアリング&生体材料 最前線、田中 順三・四宮 謙一、日刊工業 (2003).
- 15) 孤独な細胞外マトリックス、坂倉 照好、羊土社 (1995).
- 16) キャンベル スミス・生化学、佐藤 敬・高垣 啓一、西村書店 (2005).
- 17) 生体物性／医用機械工学、池田 研二・嶋津 秀昭、秀潤社 (2005).
- 18) ジュンケイラ組織学、坂井 建雄・川上 速人、丸善 (2004).
- 19) 生命の化学と分子生物学、林 利彦・水野 一乗、東京化学同人 (2003).
- 20) バイオマテリアル、中林 宣男・石原 一彦・岩崎 泰彦、コロナ社 (2002).
- 21) 生体機能分子データブック、上出 利光・小林 邦彦、中外医学者 (2001).

- 22) 接着分子ハンドブック、宮坂 昌之、秀潤社 (2000).
- 23) 再生医療工学、立石 哲也・田中 順三、工業調査会 (2004).
- 24) 血管生物学、児玉 龍彦・高橋 潔、講談社 (1997).
- 25) 日本再生医療学会雑誌, 再生医療, 第 4 巻 / 第 1 号, 2005.2, メディカル
レビュー社.

26) B. Vrhovski, A. S. Weiss, *Eur. J. Biochem.*, 258, 1-18 (1998).

2 章

3 章

27) Kuprin S, et al: Nonideality of Water-Hexafluoropropanol Mixtures as Studied by X-Ray Small Angle Scattering. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1995; 217; 1151-1156

4 章

28) 生体機械工学、林鉦 三郎・田中 正夫・佐藤 正明・谷下 一夫・土肥 健純、
丸善 (1997)