

平成 22 年度 修士論文

自己組織化型エラスチンゲルの開発



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

羽多野由季子

目次

1. 緒言	3
1-1 再生医療	3
1-2 細胞足場材料	4
1-3 細胞外マトリックス	5
1-4 エラスチン	6
1-4-1 エラスチンとは	
1-4-2 凝集・コアセルベーション	
1-4-3 エラスチンハイドロゲル	
1-5 血管平滑筋細胞	9
1-6 本研究の目的	10
2. 方法	11
2-1 水溶性エラスチンの抽出	11
2-2 エラスチン溶液の凝集温度測定	11
2-2-1 水溶性エラスチンの分画	
2-2-2 エラスチン溶液の凝集温度による濃度依存の観察	
2-3 エラスチンゲル作製	12
2-3-1 エラスチン溶液のゲル化時間測定	
2-3-2 走査型電子顕微鏡(SEM)によるエラスチンゲル微細構造の観察	
2-4 ヒト大動脈血管平滑筋細胞に対するエラスチンゲルの影響	12
2-4-1 細胞の培養と継代培養	
2-4-2 エラスチンゲル作製試薬の細胞毒性の観察	
2-4-3 免疫蛍光染色によるエラスチンゲル上細胞の観察	
2-4-4 エラスチンゲル下培養の BrdU 細胞増殖試験	
2-4-5 エラスチンゲル包埋培養の BrdU 細胞増殖試験	
2-5 エラスチンゲル伸展培養	14

3. 結果	15
3-1 エラスチン溶液の凝集温度.....	15
3-1-1 水溶性エラスチンの分画	
3-1-2 エラスチン溶液の凝集温度による濃度依存	
3-2 エラスチンゲル作製.....	16
3-2-1 エラスチン溶液のゲル化時間	
3-2-2 SEM によるエラスチンゲル微細構造の観察	
3-3 ヒト大動脈血管平滑筋細胞に対するエラスチンゲルの影響.....	23
3-3-1 エラスチンゲル作製試薬の細胞毒性	
3-3-2 免疫蛍光染色によるエラスチンゲル上細胞の観察	
3-3-3 エラスチンゲル下細胞の BrdU 細胞増殖試験	
3-3-4 エラスチンゲル包埋細胞の BrdU 細胞増殖試験	
3-4 エラスチンゲル伸展培養.....	38
 4. 考察	 48
4-1 エラスチン分子の相互作用による凝集温度への影響.....	48
4-2 エラスチンゲル作製.....	49
4-2-1 pH によるゲル化時間への影響	
4-2-2 エラスチンゲルの微細構造変化	
4-3 ヒト大動脈血管平滑筋細胞に対するエラスチンゲルの影響.....	53
4-3-1 エラスチンゲル作製試薬による細胞への影響	
4-3-2 エラスチンゲルによる細胞増殖への影響	
4-4 伸展培養による細胞への影響.....	56
 5. 結論	 58
 6. 参考文献	 59
 7. 謝辞	 60
 8. 付録	 61

1. 緒言

1-1 再生医療

再生医療は、機能障害や機能不全に陥った生体組織・臓器に対して、その機能再生をはかる医療である。現状では臓器や組織の機能が損なわれた疾患に対しては臓器移植や人工臓器に頼っているが、拒絶反応、免疫抑制や生体適合性などの医学的諸問題と、提供者不足という社会的問題とを抱えている。これらの問題を解決する手段として再生医療が注目されている。(1)

再生医療の一端として組織工学がある。組織工学とは、細胞、足場材料、サイトカインの3つの要素を組み合わせて高性能な人工臓器・組織を作製する技術である。組織工学的な人工組織は、組織の機能を再生するための細胞とその足場になる細胞外マトリックス、細胞の分化や増殖を制御するサイトカインにより生体内の組織を模倣し、生体組織と置換された後も置換部位と同様の働きをすることが求められる。これらの実現には目的の臓器・組織の機能・構造、存在する細胞の機能制御の解明が必要不可欠であり、再生医療の発展のために重要な課題である。(2)

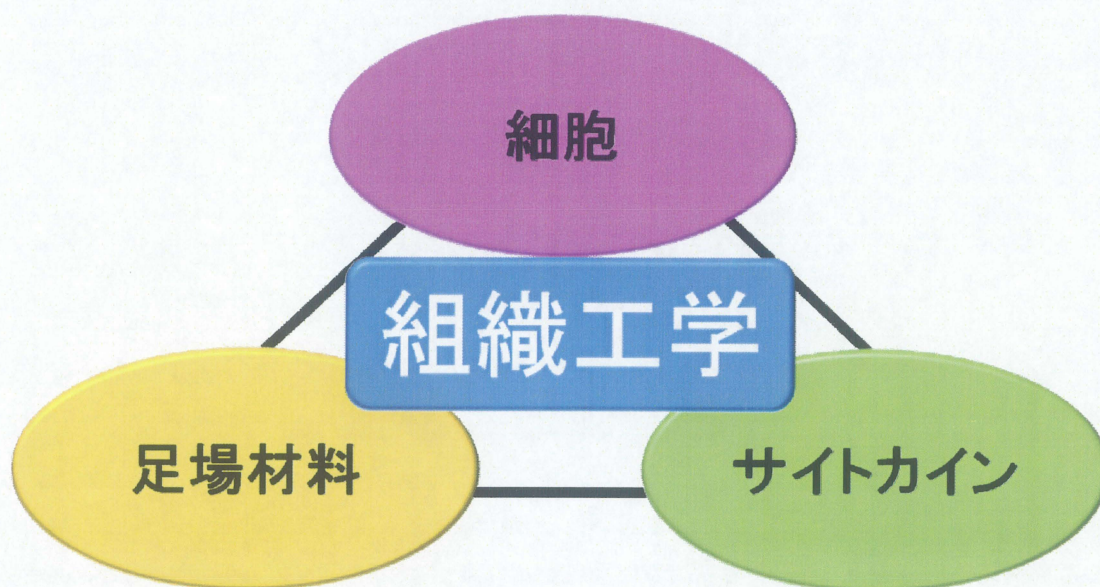


図 1-1 組織工学

1-2 細胞足場材料

血液細胞以外の体を構成するすべての細胞は、タンパク質、多糖などからなる細胞外マトリックス(天然の足場)と相互作用して存在している。通常の生体組織の欠損部では、細胞と共に天然の足場までなくなってしまうため、組織の再生誘導のためには人工的な 3 次元構造を持つ材料を欠損部位に与えなければならない。このような、天然の足場の代替物となる材料が細胞足場材料である。細胞足場材料には、再生場所で細胞を立体的に配置し、そこで増殖・分化・形態形成を促進させるような人工的な細胞外マトリックスが必要である。足場として要求される条件は、生体吸収性・多孔性・細胞親和性などである。生体吸収性が遅過ぎると、材料は長くその場所に残ってしまい、組織再生を物理的に邪魔することになる。逆に早過ぎると足場として機能しない。さらに細胞増殖因子などのタンパク質を足場内にとどめ、徐放しなければならない。また足場の多孔性は、細胞を足場内部まで入り易くさせると共に、細胞への十分な酸素や栄養物の供給と細胞からの老廃物の除去を可能にするために必要である。

現在はコラーゲンスポンジ、ゼラチンシート、生体吸収性のポリ乳酸系材料などを足場として用いることで、皮膚真皮・気管・食道・末梢神経・脳硬膜・心膜・胸膜などを体内で再生誘導することが可能となっている。(3)

細胞足場材料の発展のためには、細胞足場材料に利用できる生体吸収性材料の研究開発だけでなく、それらの材料からの足場の作製技術も重要である。それゆえ、3 次元構造、力学的特性、生体吸収性、化学特性、生物特性などを制御させるために、加工性・成形性が適切であることが材料に求められる。3 次元加工技術は足場材料の開発の基盤となり、再生誘導させたい生体組織の種類に合わせた足場材料を、細胞あるいは細胞増殖因子などと組み合わせて、体内での再生誘導に利用される。(4)

さらに、より効率的に再生誘導させるために細胞を足場材料に包埋し、そのまま体内に埋め込む方法が挙げられる。この方法は、周囲組織からの細胞侵入よりもすばやく、確実に再生したい個所に細胞を入れることが可能である(図 1-2)。現在、細胞包埋の研究は細胞外マトリックスの一種で、体内に多く含まれるタンパク質のコラーゲンを用いて多くなされており、コラーゲンゲル内での細胞の生存・増殖は報告されている。(5)しかし、細胞の影響でコラーゲンゲルが収縮することも報告されている。(6)さらにコラーゲンゲルでは伸縮性に乏しく、血管や肺など伸縮する臓器・組織には適さない。

つまり、細胞包埋用足場材料に利用できる細胞外マトリックス材料の研究が進むことで、今後の再生医療の発展に繋がると考えられる。

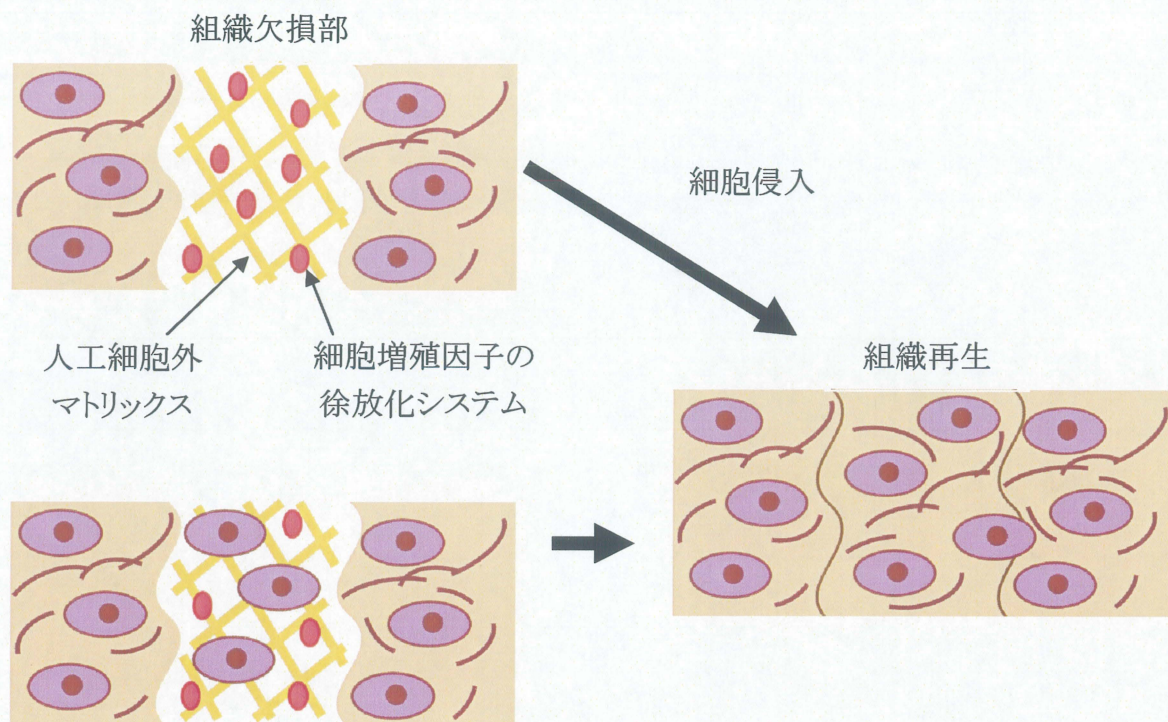


図 1-2 組織再生の概略図⁽³⁾

1-3 細胞外マトリックス

細胞外マトリックスとは、組織中の細胞と細胞の間のすきまを満たす物質であり、全身のあらゆる臓器・組織に存在している。細胞外マトリックスの役割として、臓器の支持、境界を作ることなどがある。また、役割の一つとして細胞の生存環境を形成しているため、細胞の移動や接着、分化、増殖にも細胞外マトリックスが関係している。それゆえ、組織工学において細胞外マトリックスは重要であり、足場材料として研究されている。⁽⁷⁾

細胞外マトリックスの主な種類は、コラーゲン、エラスチンなどの繊維性タンパク質や、フィブロネクチンやラミニンといった接着性糖タンパク、プロテオグリカンやグリコサミノグリカンなどの複合糖質である。

1-4 エラスチン

1-4-1 エラスチンとは

エラスチンとは、弾性を有する繊維状タンパク質で、大動脈、靱帯、肺、皮膚、結合素子などに多く発現している。これらの組織の弾性はエラスチンの特性に基づいている。

生体組織に含まれるエラスチンは、分子量 67kDa の前駆体であるトロポエラスチンがリシルオキシターゼによって架橋されてできている。その組織を酸・アルカリ・アルコール等で処理した後に残る不溶性タンパク質と定義されている。

エラスチンの一次構造は疎水性アミノ酸が約 92%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、その構造はデスモシン・イソデスモシン等による架橋構造である。エラスチンの特異的なアミノ酸配列として VGVAPG 構造を有していることが知られており、この部分が細胞接着領域となっている。また、主な架橋領域である KAAK が以下の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。

<Elastinの構造>

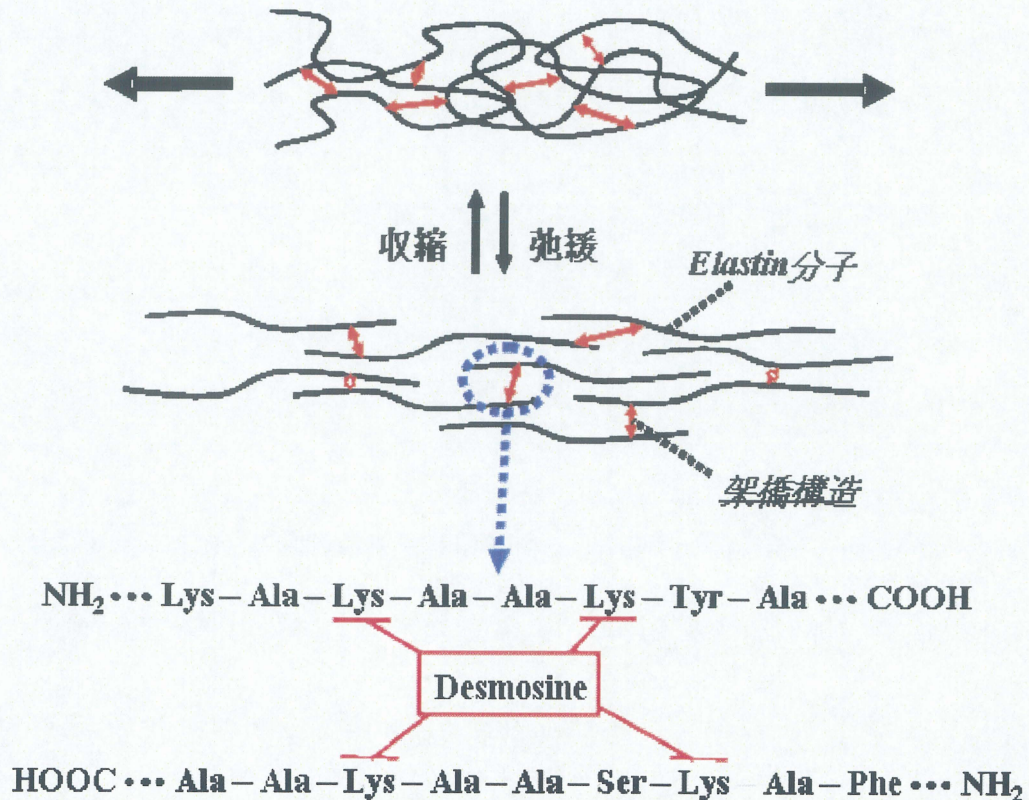


図 1-2 エラスチンの構造

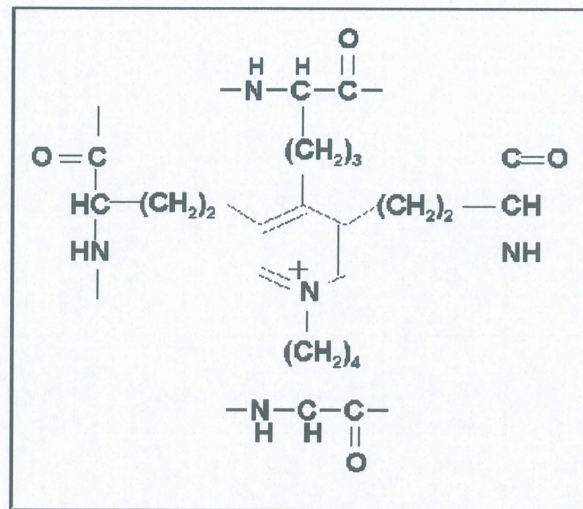
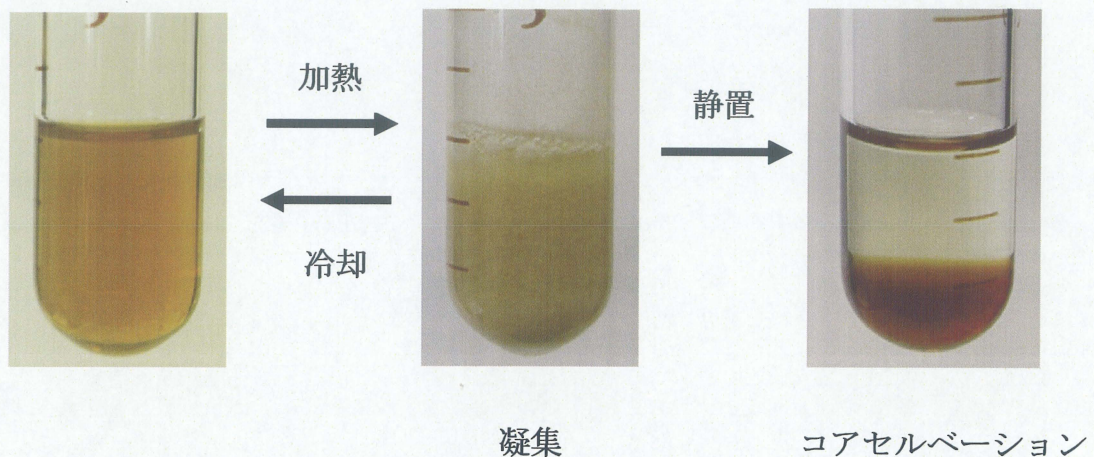


図 1-3 デスモシン架橋構造

1-4-2 凝集・コアセルベーション

エラスチン水溶液を加熱すると「凝集」が起こる。これは、分子内(分子間)疎水性相互作用により、分子が折りたたまれた構造をとって互いに集合し合う為である。凝集は溶液中で白濁という形で観察される。エラスチン溶液の濃度が低い場合は、凝集後に静置した状態で加熱を続けると液-液二相分離が起こり、下相に高濃度の溶液が蓄積する。この現象はコアセルベーションと呼ばれ、一般にコロイド粒子に富む流動性の相とコロイド粒子を含まない液相に分かれる液-液相分離現象と定義される。



凝集

コアセルベーション

図 1-4 エラスチン溶液の凝集・コアセルベーション

1-4-3 エラスチンハイドロゲル

熱シュウ酸処理等の方法で不溶性エラスチンの架橋構造を破壊、断片化することで水溶化することが可能であり、さらに架橋剤を加えることで架橋構造を形成しゲル化させることができる。エラスチンの一次構造を保ったままゲル化させることができるので、エラスチン本来の性質である弾性のある程度持たせられる。それゆえ、そのゲルは弾性に優れている。

また、これまでにゲル化させる際の温度やエラスチン及び架橋剤濃度を变化させることで、ゲルの力学的強度を制御できることが分かっている。そのため、生体組織に近似した弾性を持たせることも可能である。

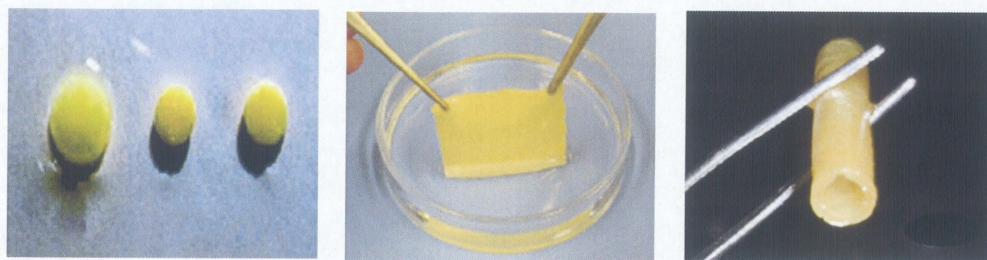


図 1-6 エラスチンゲル加工例

1-5 血管平滑筋細胞^(8,9)

血管の平滑筋細胞は紡錘型の細胞で、長楕円形の核を一つ持つ単核細胞である。中血管以上の血管で最も数が多い細胞である。通常は中膜に存在し、血管の構造を維持し、血管を収縮させたり弛緩させたりしている。

平滑筋細胞は、血管発生過程や病態においては多様な機能を示す。血管発生過程においては内皮細胞によって形成された管腔を覆うようにして漏れのない血管を構築する。このような胎児期の平滑筋細胞は合成型と呼ばれ、増殖能が高く、細胞外マトリックスや増殖因子などを盛んに産生する。この時期の細胞はミトコンドリアやゴルジ体、粗面小胞体、リボソームなどの細胞内小器官に富んでおり、ストレスファイバーに乏しい。

血管の分化・成熟とともに平滑筋細胞は収縮に特化した機能を持った、収縮型と呼ばれる分化した形質を示すようになる。収縮型の平滑筋細胞は増殖能や遊走能、細胞外マトリックス産生能を持たない。そのため、細胞内小器官に乏しいが、収縮性があり、アクチンやミオシンのストレスファイバーを持つ。

しかし、平滑筋細胞の分化は可逆的であり、外的ストレスに応じて再び未分化な形質(合成型)を示すようになる。これを形質変換と呼ぶ。形質変換を起こした平滑筋細胞は、再び増殖・遊走能を持ち、増殖因子や細胞外マトリックスを産生する。このような平滑筋細胞の機能は、血管傷害に対する治癒機構として重要と考えられるが、慢性に引き続くと組織の再構築が進み、病態形成に繋がる。

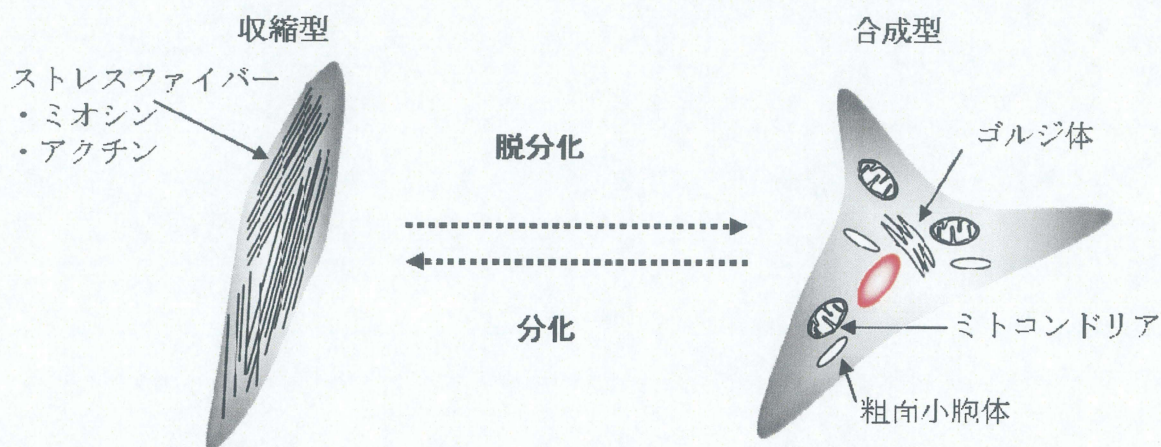


図 1-7 平滑筋細胞の分化・脱分化⁽⁷⁾

1-6 本研究の目的

組織欠損部の充填剤には、生体適合性、生体吸収性、生体組織と同等の力学的強度を持っていること、さらに組織再生の促進などが重要となる。特に、血管などの弾性組織では生体組織と近い力学的強度として伸縮性を持たせなければならない。しかし、これらを兼ね備えた材料は現在も研究されており、完璧なものはない。生体組織を模倣し、組織再生を促すためには、細胞を包埋して培養する材料が必要である。多く研究されているコラーゲンは剛性を有しているが弾性に乏しいため、血管などの弾性組織には適さない。本研究室ではエラスチンの組織工学的な足場材料の研究を行っており、現時点で生体内エラスチンの弾性をある程度保持しながら成型加工の容易なエラスチンゲルの作製に成功している。

そこで、本研究では生体組織に伸縮性および弾性を与える重要なタンパク質であるエラスチンを用いて、弾性組織の欠損部に充填するための細胞包埋用足場材料として、体温付近(37℃)でのゲル化が可能な新規なエラスチンゲルの開発を目的とした。

対象とする組織は血管を選択し、中膜に多く存在する平滑筋細胞を用いて検証した。

2. 方法

2-1 水溶性エラスチンの抽出 (8-1-1,2)

三重県松阪食肉流通センターから頂いたブタ大動脈の中膜層以外の部分を除去し、細かく刻み、エタノールで脱水を行い乾燥させた。精製した不溶性エラスチンをシュウ酸処理した上澄み液を透析チューブに入れ、外液の pH が 5~6 程度になるまで透析を行った。チューブから取り出した液を遠心し、その上澄み液を膜フィルター・ガラスフィルターで吸引ろ過してできたろ液を耐圧瓶に入れ、2~3 日凍結乾燥することで水溶性エラスチンを得た。

2-2 エラスチン溶液の凝集温度測定

2-2-1 水溶性エラスチンの凝集温度測定と分画 (8-1-3)

凝集温度の測定は、透過光測定装置によって行った。まずエラスチン溶液を 1%(w/w)で調製し、完全に溶かすために冷蔵庫で静置した。その後、測定用のセルに移し、そのセルを透過光測定装置にセットした。恒温槽で温度を上昇させていき、その透過光強度を測定した。透過光強度が一番高い値と低い値の中央値を凝集温度とした。

2-1 で抽出した水溶性エラスチンを凝集温度によってエラスチン A~E の 5 種類にクラスに分画した。以下クラス分けした水溶性エラスチンの凝集温度。(8-2)

クラス	A	B	C	D	E
凝集温度(℃)	~22. 5	22.5~25	25~30	30~35	35~

2-2-2 エラスチン溶液の凝集温度による濃度依存の観察

水溶性エラスチン 1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%となるように溶液を調製し、その凝集温度を測定した。

2-3 エラスチンゲル作製

2-3-1 エラスチン溶液のゲル化時間測定

30%(w/w)のエラスチン溶液を架橋剤の Dode-DSP の濃度を一定にし、ゲル化促進剤の濃度を変化させたものと、Dode-DSP 濃度を変化させたもののゲル化時間を測定した。

まず、Dode-DSP を架橋倍率 3 倍に調製し、そのモル数に対して 0.3 倍、0.5 倍、1 倍、1.5 倍となるように調製した。各々の溶液を 37℃のインキュベーター中で静置し、10 分毎に傾斜法を用いてゲル化の確認を行った。傾斜時に流動性がなければ、その時点でゲル化と判断した。

次に、Dode-DSP 濃度を架橋倍率 0.05 倍、0.1 倍、0.5 倍、1 倍に調製し、各濃度に対して同モル数になるようにゲル化促進剤を加え、同様の方法でゲル化時間を測定した。

2-3-2 走査型電子顕微鏡(SEM)によるエラスチンゲル微細構造の観察(8-2)

水溶性エラスチン 30%(w/w)、架橋倍率 3 倍のエラスチンゲルにトレハロース、ヒアルロン酸を各々の濃度で添加し、37℃でゲル化させた。

それらのエラスチンゲルをリン酸緩衝液(PB)で洗浄後、前固定として 2.5%グルタルアルデヒド/PB で 2 時間固定した。固定後、PB による洗浄を 4℃で 15 分毎に 4 回行った。洗浄後に後固定として 1%四酸化オスミウム/PB で 1.5 時間固定した。固定後、PB による洗浄、エタノールによる段階的脱水、t-ブチルアルコールによる置換を行い、凍結乾燥機を用いて試料を乾燥した。これらの資料は真空イオン蒸着装置を用いて金イオンコーティングし、SEM で観察した。

2-4 血管平滑筋細胞に対するエラスチンゲルの影響

2-4-1 細胞の培養と継代培養(8-3,4)

Cell systems 社から購入したヒト大動脈血管平滑筋細胞を 37℃/5%CO₂ インキュベーター内で培養した。培地は CS-C 培地を用いた。本研究で使用したヒト大動脈血管平滑筋細胞は P5～P9 であった。

sub-confluent(70%~80%)ほどに増殖した時点で再びトリプシン処理にて細胞を剥離させ、細胞懸濁液を作成し、継代培養を行った。

2-4-2 エラスチンゲル作製試薬の細胞毒性の観察

細胞を 10%FBS/CS-C 培地の入った 24well プレートに播種し、37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間後、各濃度のエラスチンゲル作製試薬を添加し、定期的に位相差顕微鏡と動画撮影(8-5)で観察した。エラスチンゲル作製試薬として Dode-DSP、DSP、炭酸ナトリウム(Na₂CO₃)、トリエチルアミン(TEA)を用いた。

2-4-3 免疫蛍光染色によるエラスチンゲル上細胞の観察(8-6)

水溶性エラスチン 30%(w/w)、架橋倍率 3 倍で作製したエラスチンゲルとトレハロースを添加したゲルを PBS で洗浄し、細胞を上から播種し、2 日間培養した(図 2-1,a)。2 日後に培地を取り除き、PBS で洗浄後、-20°C acetone/methanol(1:1)で 5 分間、室温で固定した。固定後、固定液を取り除き、10 分間風乾した。乾燥後、1%BSA/PBS で 20 分間置換し、一次抗体として、mouse anti-SM α -actin antibody を添加し、4°C で over night した。十分に洗浄した後、二次抗体として Anti-IgG mouse,goat-poly DyLight649 を添加し室温で 90 分間静置した。その後、十分に洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

2-4-4 エラスチンゲル下培養の BrdU 細胞増殖試験(8-7)

細胞を 10%FBS/CS-C 培地の入った 96well プレートに播種し、37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した後、各濃度の Dode-DSP、Na₂CO₃ を加えたエラスチン溶液を上から暴露した(図 2-1,b)。24 時間後、BrdU ラベリング溶液入りの培地を 100 μ l ずつ各 well に加え、37°C、5%CO₂ インキュベーター内で 12 時間培養した。と 3 日目でそれぞれ BrdU 細胞増殖試験を行った。PBS で洗浄した後、固定液を各 well に 200 μ l ずつ加え、-20°C で 30 分間固定した。PBS で洗浄後、各 well に 100 μ l のヌクレアーゼ使用液を加え、37°C で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄後、anti-BrdU-POD 抗体使用液を 100 μ l ずつ各 well に加え、37°C で 30 分間インキュベートした。洗浄緩衝液で洗浄後、100 μ l の peroxidase 基質を加え、室温で positive サンプルが緑色に呈するまで静置した。490nm をリファレンスにし、405nm でのサンプルの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

3 日後も同様に BrdU 細胞増殖試験を行った。

2-4-5 エラスチンゲルによる包埋培養の BrdU 細胞増殖試験(8-8)

エラスチン溶液を Dode-DSP 濃度が架橋倍率 3 倍、0.5 倍となるように調製し、架橋倍率 3 倍では架橋剤のモル数の 1/2 モル数、架橋倍率 0.5 倍では架橋剤と同モル数の Na_2CO_3 を加えた。よく混ぜた後、96well プレートに移し、作成した細胞懸濁液を各溶液に播種密度が $2.5 \times 10^4 \text{ cells/gell}$ となるように加え、 $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ インキュベーターでゲル化するまで静置した(図 2-1,c)。ゲル化確認後、培地を加え、再び $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ インキュベーターに入れ、培養した。

培養 1 日目と 3 日目で、2-4-3 で記述したように BrdU 細胞増殖試験をそれぞれ行った。

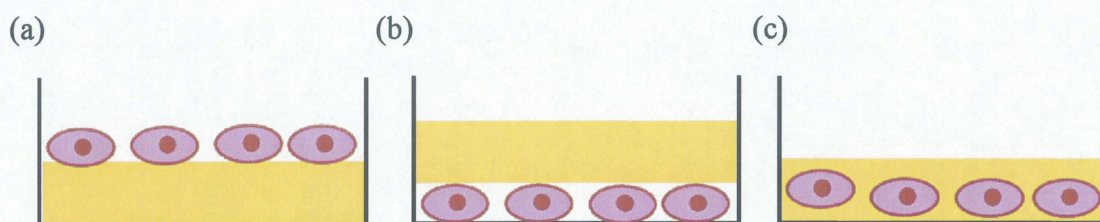


図 2-1 エラスチンゲルを用いた培養

(a) ゲル上, (b) ゲル下, (c) 包埋

2-5 エラスチンゲル伸展培養(8-9)

2-4-5 に従い調製したエラスチン溶液を、円形(直径約 10mm)になるようにシリコンで作製した型に入れ、細胞懸濁液を加えてよく混ぜた後、 37°C 、1~2h インキュベートした。ゲル化確認後、真ん中を内径約 4mm になるようにくり抜き、リング型にした。そのまま 24 時間静置培養後、24 時間伸展させた。伸展条件は、1 秒毎に 300 μm 引張り、900 μm の点で 5 秒静止し、1 秒毎に 300 μm 戻す。0 μm の点で 5 秒静止させた後、再び 1 秒毎に 300 μm 引っ張った。これを 24 時間繰り返した。

伸展後、免疫蛍光染色で観察した。

3. 結果

3-1 エラスチン溶液の凝集温度

3-1-1 水溶性エラスチンの分画

抽出した水溶性エラスチンの凝集温度を測定し、各々の溶液を凝集温度でエラスチン A~E に分画した(図 3-1)。

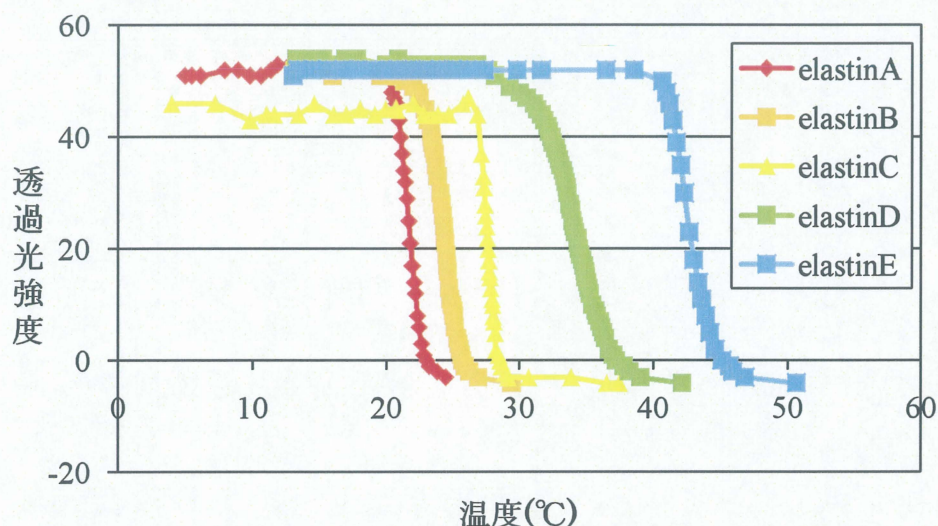


図 3-1 エラスチン溶液の凝集温度

3-1-2 エラスチン溶液の凝集温度による濃度依存

水溶性エラスチンの濃度を 1~70%まで変化させた時の凝集温度を各々測定した。その結果、エラスチンの濃度が高くなるにつれて凝集温度は上昇し、濃度が高過ぎると 90℃においても凝集しなかった。濃度を 1%から 50%に変化させた時、凝集温度は約 55℃上昇した(表 3-1)。水溶性エラスチン濃度が 30%より高くなると、凝集温度は急激に増加した(図 3-2)。

表 3-1 エラスチン濃度変化時の凝集温度

サンプル	1%	2%	5%	10%	20%
凝集温度(℃)	17.9	19	20.5	21.6	27.0
	30%	40%	50%	60%	70%
30.0	41.1	41.1	70~75	凝集せず	凝集せず

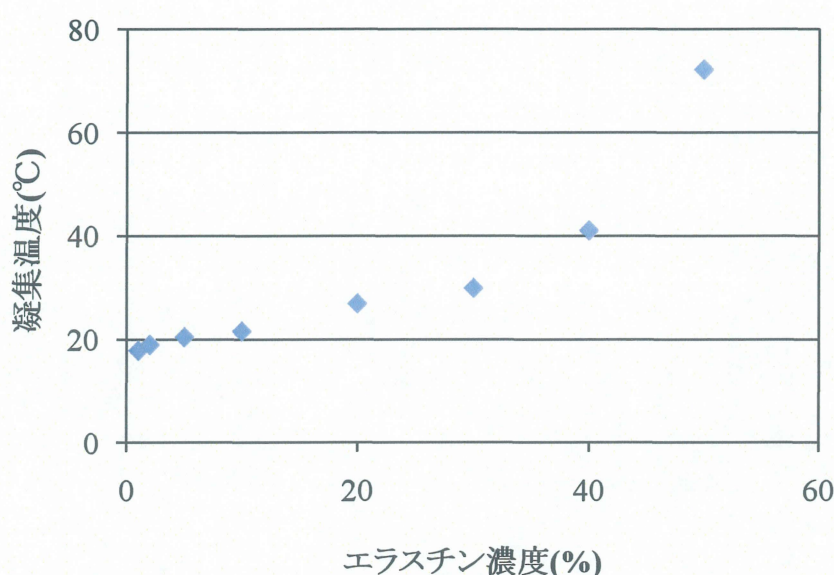


図 3-2 エラスチン濃度変化時の凝集温度

3-2 エラスチンゲル作製

3-2-1 エラスチン溶液の凝集温度・ゲル化時間

30%(w/w)エラスチン、架橋倍率3倍の溶液にゲル化促進剤として Na_2CO_3 、TEAを各濃度で添加した。各濃度は架橋剤の濃度に対して1倍、0.5倍、0.1倍のモル量である。 Na_2CO_3 、TEAは共に強塩基であるため、添加量が増加するとpHは高くなった(表 3-2)。その結果、 Na_2CO_3 添加のエラスチン溶液の凝集温度は最大で0.2°C程上昇した。TEA添加では最も高い濃度では凝集する前にゲル化し、凝集しなかった。凝集したサンプルでは最大で10°C以上高い値となった(図 3-3)。

また、ゲル化は傾斜して液面に流動性が無くなったのを確認した(図 3-4)。 Na_2CO_3 、TEA添加により、37°Cでのゲル化が短時間で可能となった。 Na_2CO_3 、TEAどちらも、濃度が高くなるにつれてゲル化時間は短くなる傾向が見られ、ゲル化時間は500分程短縮した(図 3-5)。

次にDode-DSPの架橋倍率を変化させた時のゲル化時間を測定した。架橋倍率は1倍、0.5倍、0.1倍、0.05倍とした。その結果、架橋倍率が高いほどゲル化時間は短縮された(図 3-6)。架橋倍率0.1倍、0.05倍のサンプルは非常に弱いゲルで、ゲルの上からPBSを添加すると容易に溶けた。

表 3-2 添加物濃度と pH

添加物	濃度(mM)	pH
なし	0	7.4
Na ₂ CO ₃	8.6	7.9
	43.3	8.2
	86.3	8.6
TEA	8.7	8.1
	43.3	9.1
	86.3	9.7

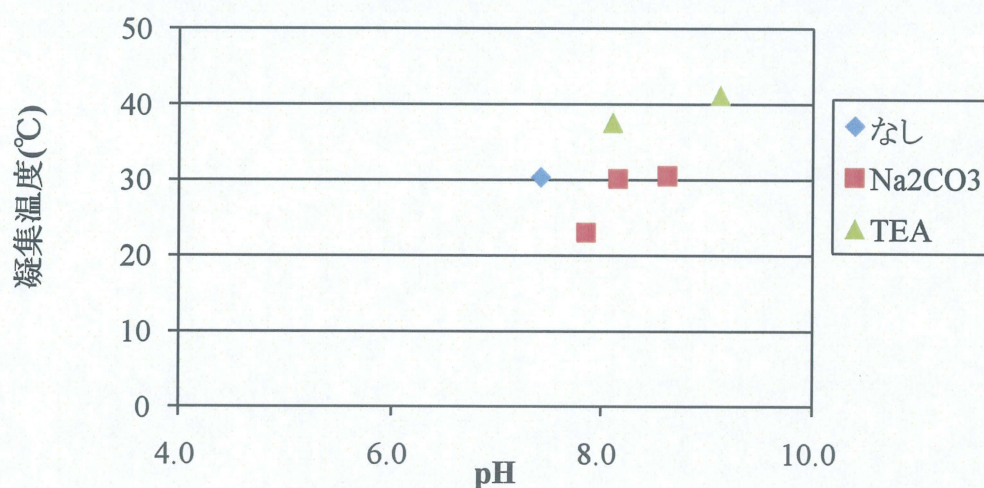


図 3-3 pH による凝集温度の変化

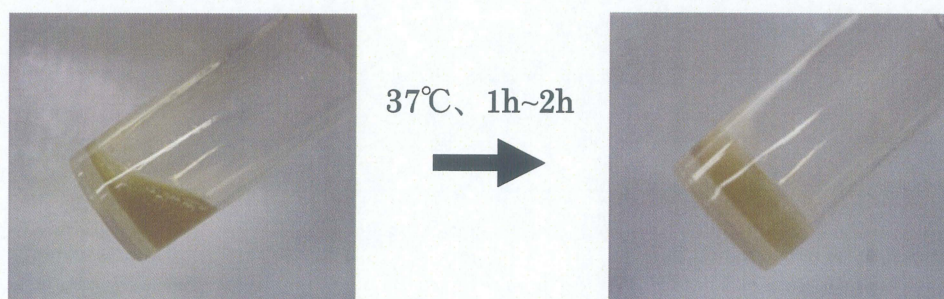


図 3-4 エラスチン溶液のゲル化

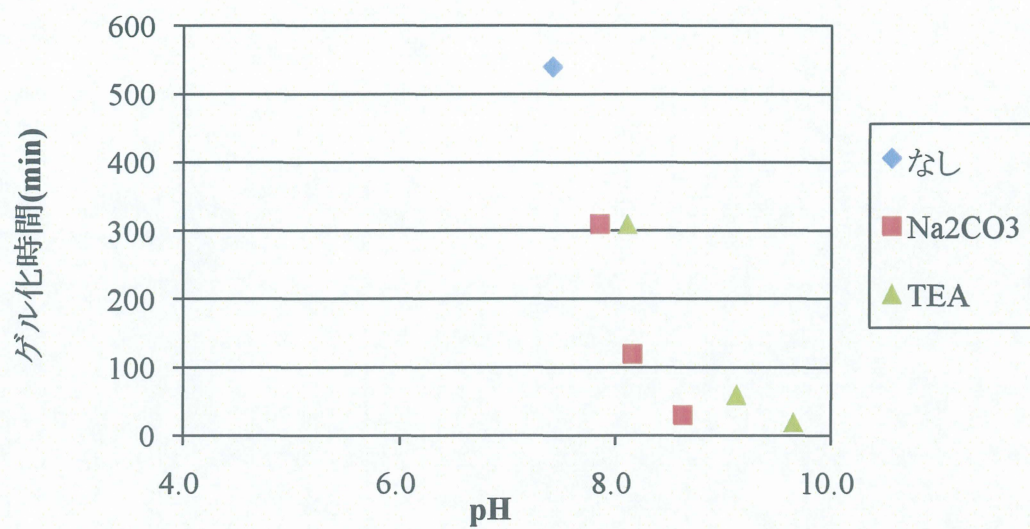


図 3-5 pH によるゲル化時間の変化

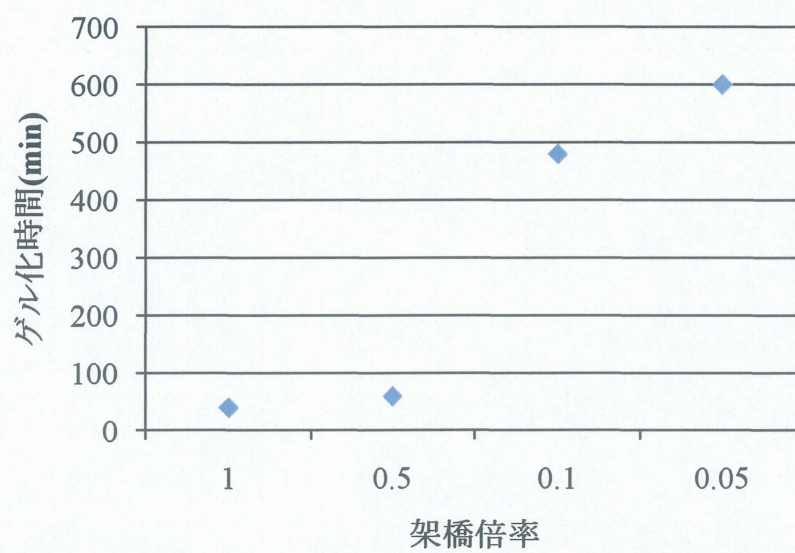


図 3-6 Dode-DSP 架橋倍率によるゲル化時間の変化

3-2-2 SEM によるエラスチンゲル微細構造の観察

エラスチンゲルに添加物としてHAとトレハロースを各々添加し、その微細構造の変化をSEMで観察した。その画像を解析した結果、添加物による空隙率への影響は見られなかった(図3-7)。しかし、エラスチンゲル内の孔径には変化が見られ、HA添加では、濃度が高くなるほど大きな径の孔が見られ、平均孔径は 3.7 ± 1.6 から 4.3 ± 4.2 まで変化した(図3-8)。さらに、HA濃度が高いと不均一な構造となり、0.3%までは1~5 μm の径の孔が多くを占めていたが、HA1%以上の濃度では10 μm 以上の径の孔が存在するようになった。トレハロース添加では、トレハロース0.3mMまでは孔径が小さくなり、添加物なしとトレハロース0.1mMでは $3.1 \pm 1.6\mu\text{m}$ から $1.8 \pm 0.5\mu\text{m}$ まで変化した。トレハロース0.5mMでは不均一な構造となり、大きな孔の中にいくつか小さな孔が見られた(図3-9)。孔径分布は、トレハロース0.5mMの時に大きく変化し、10 μm 以上の孔径が存在した。(図3-10)

以上の結果より、HA、トレハロース添加によりエラスチンゲル微細構造は変化し、添加物濃度が高くなるほど不均一な構造になることを示した。

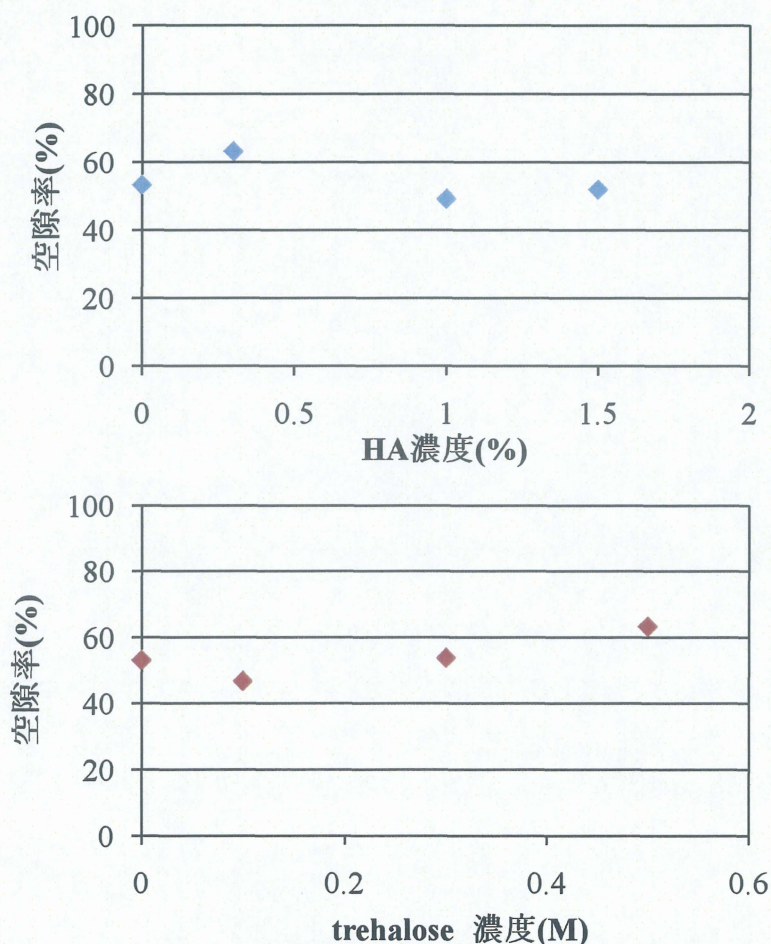


図 3-7 添加物による空隙率の変化

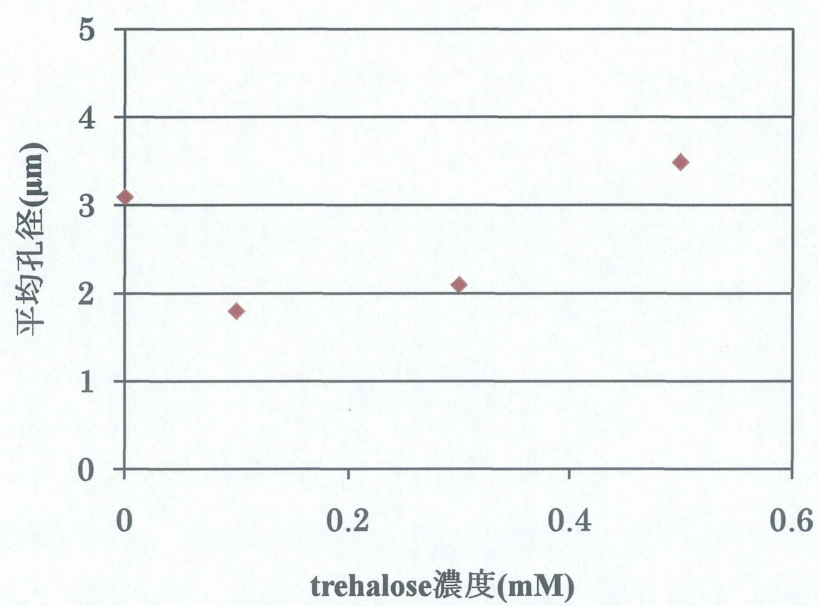
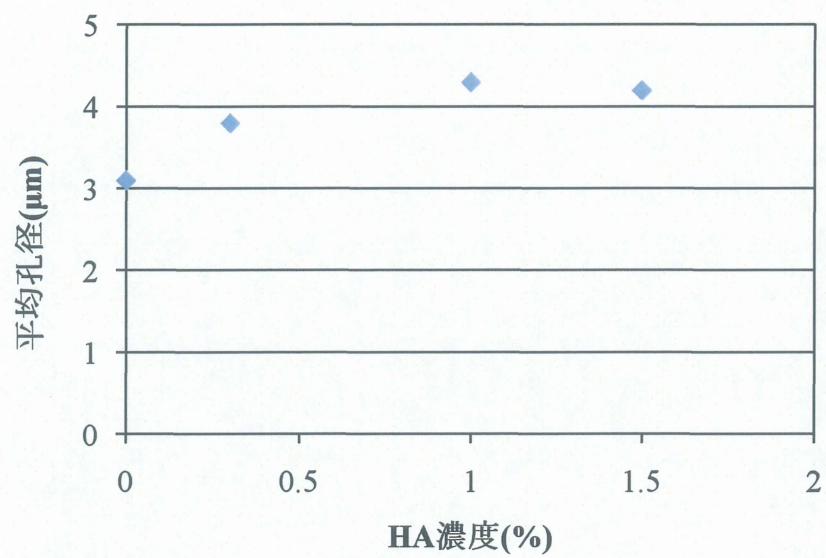


図 3-8 エラスチンゲル内の平均孔径

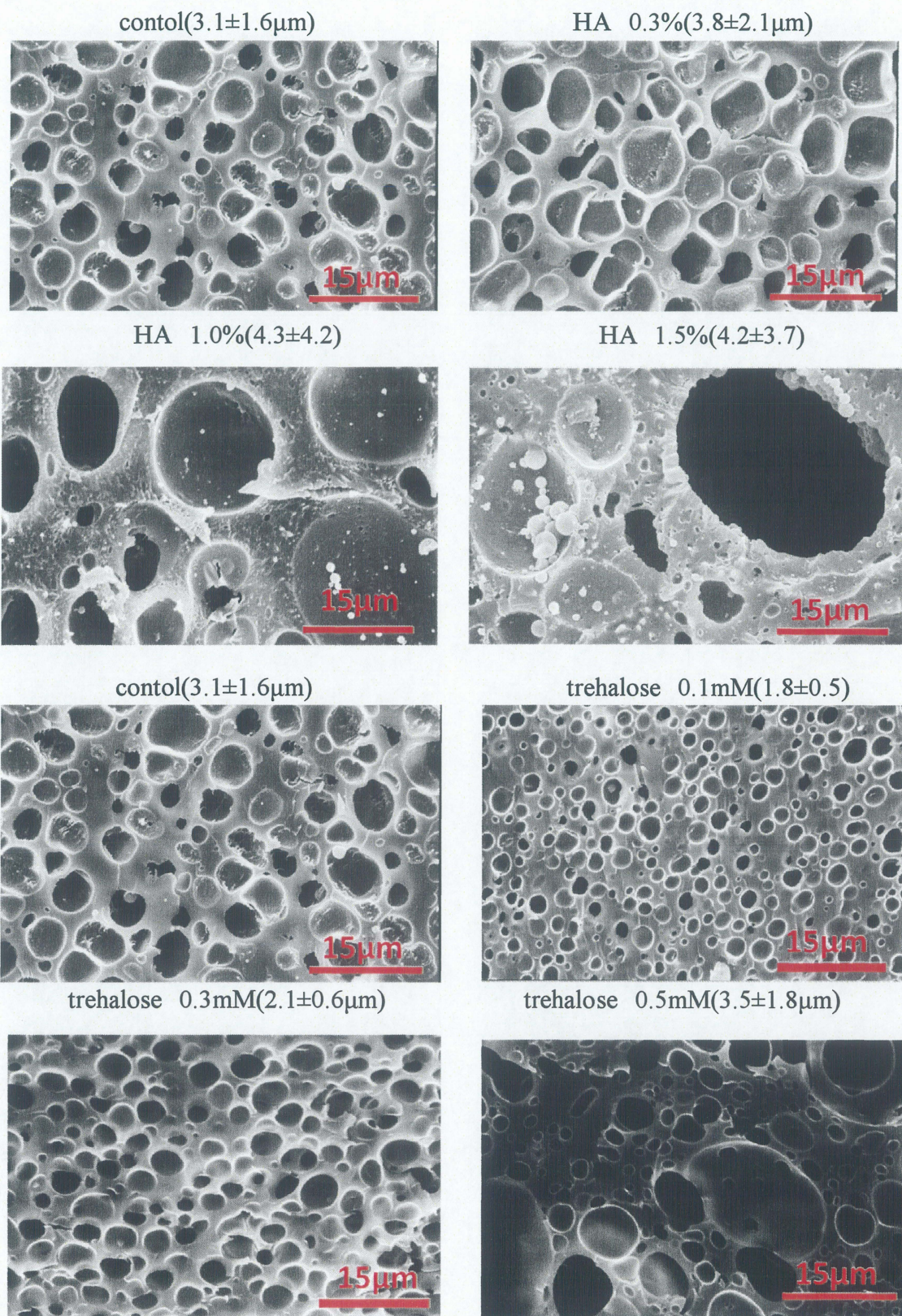


図 3-9 エラスチンゲル微細構造

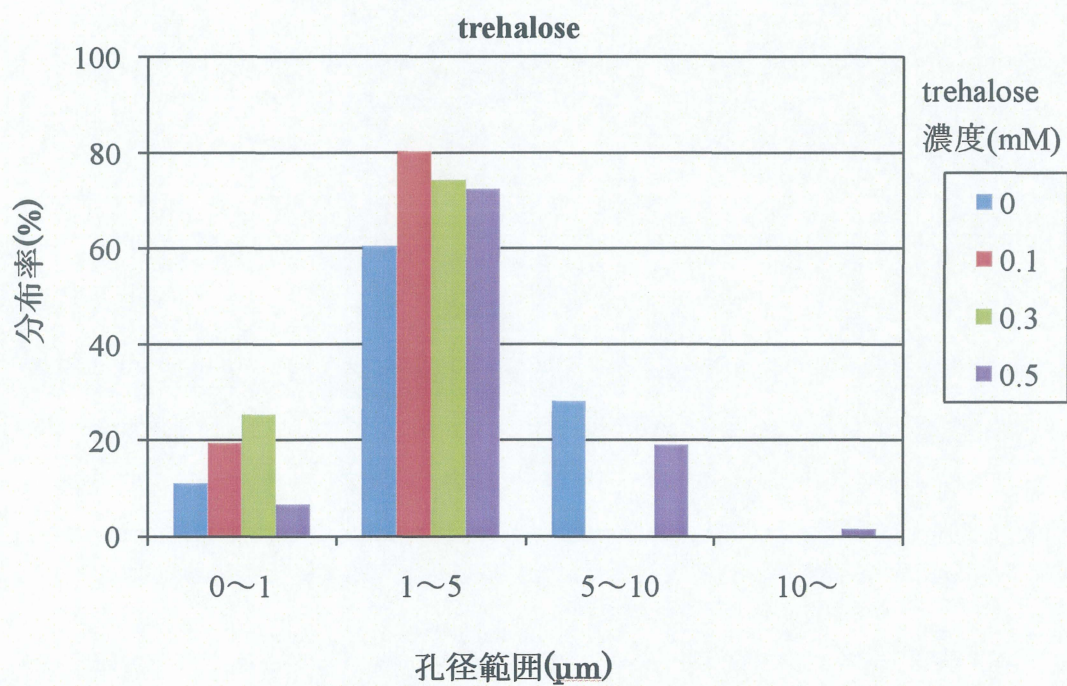
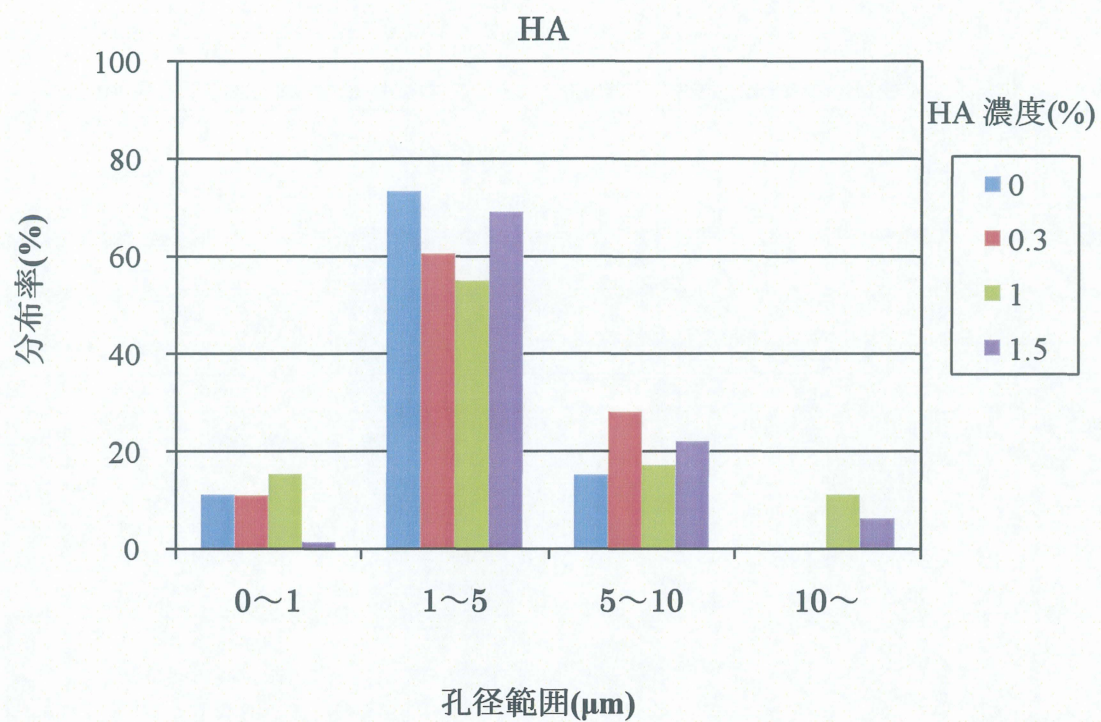


図 3-10 エラスチンゲル内の孔径分布

3-3 ヒト大動脈血管平滑筋細胞に対するエラスチンゲルの影響

3-3-1 エラスチンゲル作製試薬の細胞毒性

まず、ゲル化促進剤として用いた Na_2CO_3 、TEA の毒性を観察した。24well プレートに播種した細胞に各濃度の溶液を暴露し、位相差顕微鏡で観察した。TEA 添加の結果、添加物無しの control の細胞は増殖した(図 3-11, a)。8.6mM では暴露後 15 分で細胞形態に異常が見られ、120 分後には 5 割程度の細胞が剥がれた(図 3-11, b)。43.3mM では暴露後すぐに形態が異常になり、15 分後にはすべて剥がれた(図 3-11, c)。86.3mM では暴露後すぐに接着していた細胞はすべて剥がれた(図 3-11, d)。

Na_2CO_3 は動画撮影を行い、細胞毒性を観察した。その結果、43.3mM、8.6mM では細胞は 24 時間後も増殖しており、細胞毒性は見られなかった(図 3-12, a, b)。86.3mM では 30 分で形態に変化が見られ、1 時間程度ではほとんどの細胞が丸い形態となった(図 3-12, c)。

以上より、TEA は全ての濃度で細胞毒性を示し、 Na_2CO_3 は 86.3mM では細胞毒性を示したが、43.3mM、8.7mM では細胞毒性を示さなかった(表 3-3)。

次に、架橋剤として用いた Dode-DSP の毒性を観察した。10mM 以上の濃度では添加直後で変化はなかったが、1 時間後に白濁したためそれ以降は観察できなかった。添加物無しの control の細胞は 48 時間後に増殖した(図 3-13, a)。1mM、0.1mM は位相差顕微鏡で観察し、48 時間後、細胞増殖を確認した(図 3-13, b,c)。

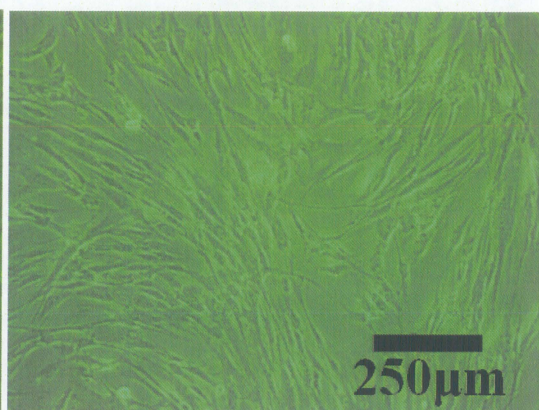
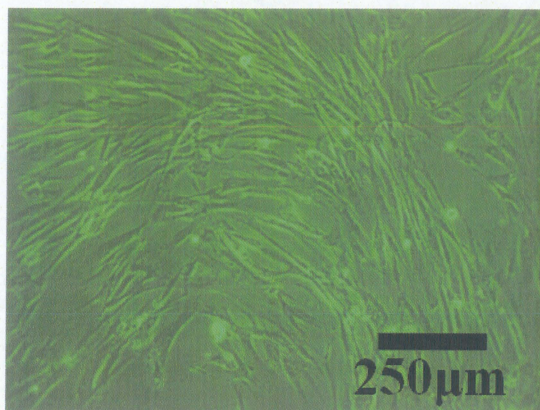
また、架橋倍率 3 倍(86.3mM)時の Dode-DSP に含まれる DSP のモル量に相当する濃度(173mM)で DSP を細胞に暴露した結果、6 時間後に細胞の形態に異常が見られ始め、24 時間後にはほとんどの細胞が丸い形態になり、48 時間後には接着していた細胞がすべて剥がれてしまった(図 3-14)。

以上より、Dode-DSP は 1mM、0.1mM では細胞毒性は示さず、DSP は 173mM では細胞毒性を示した(表 3-4)。

(a)

0min

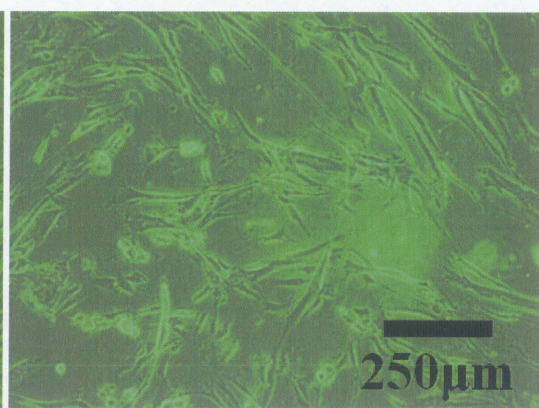
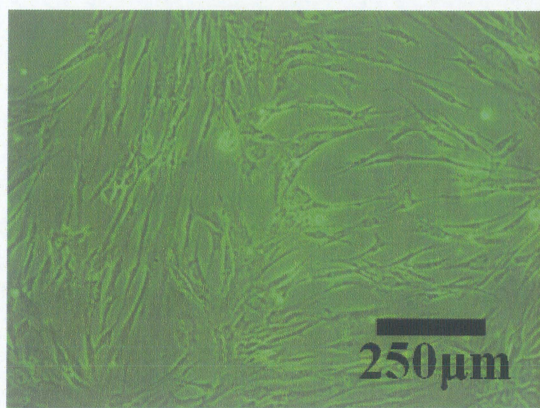
120min



(b)

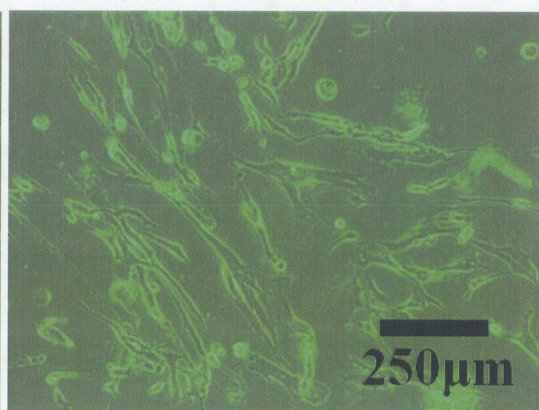
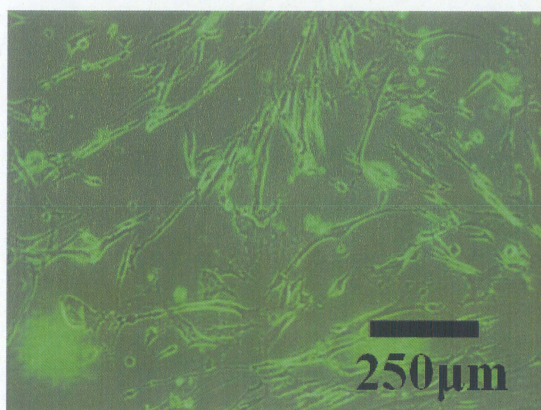
添加前

添加直後



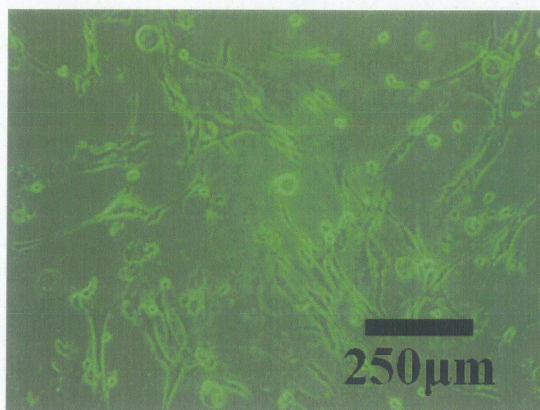
15min

30min

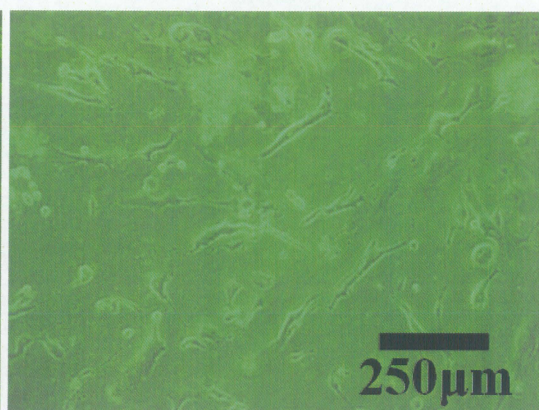


(b)

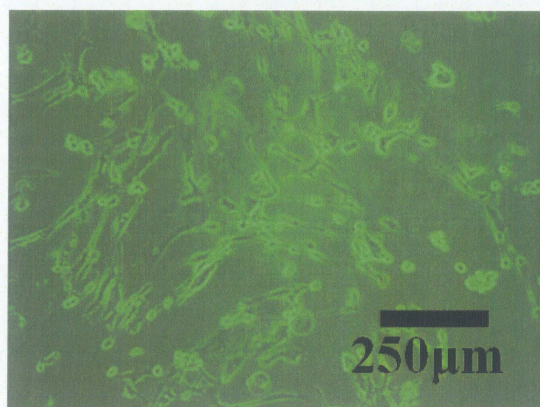
45min



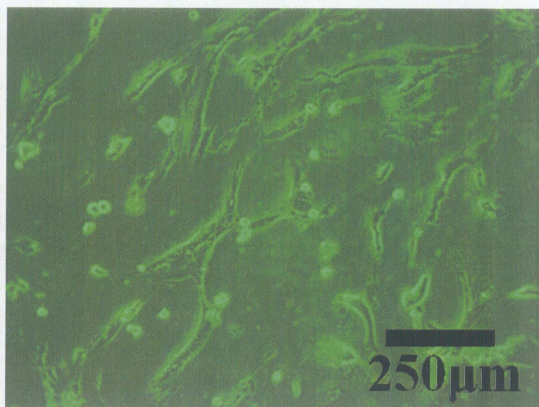
60min



90min

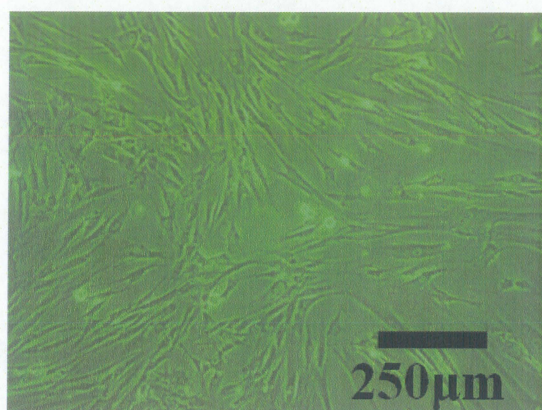


120min

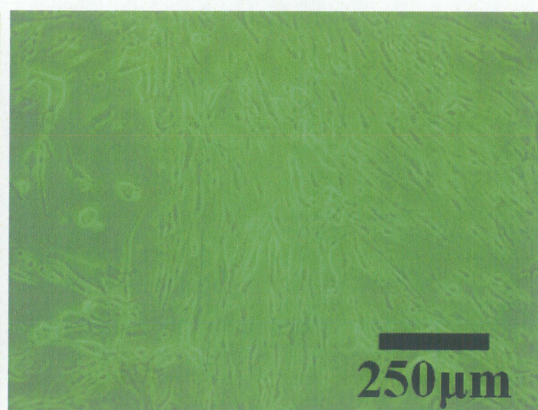


(c)

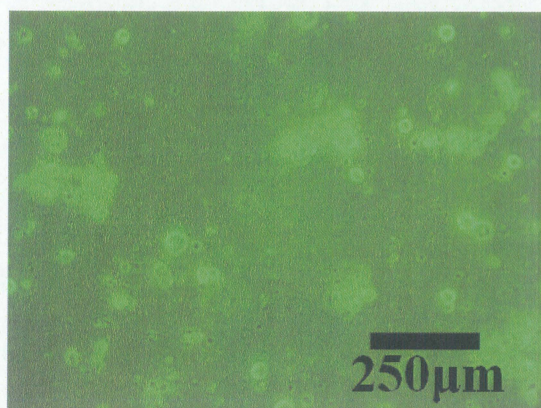
添加前



添加直後



15min



(d)

添加前



添加直後

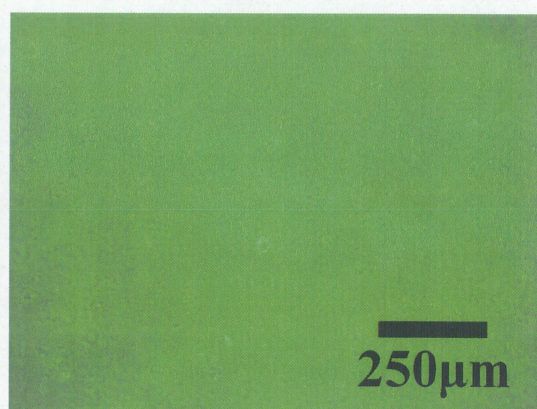


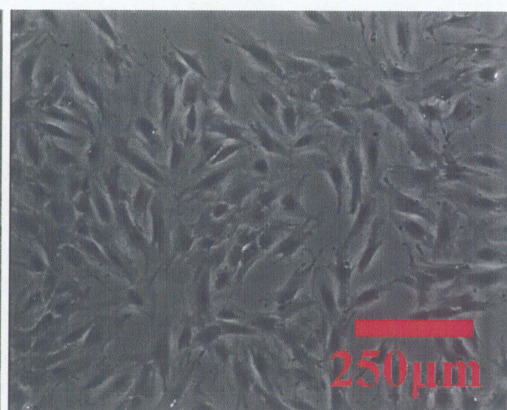
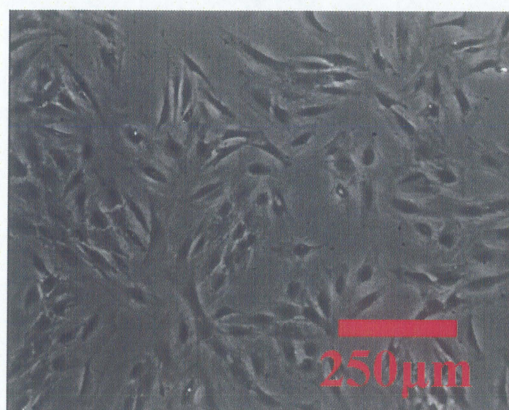
図 3-11 TEA による細胞毒性

(a) control, (b)8.7mM, (c)43.3mM, (d)86.3mM

(a)

添加前

6h



12h

24h



(b)

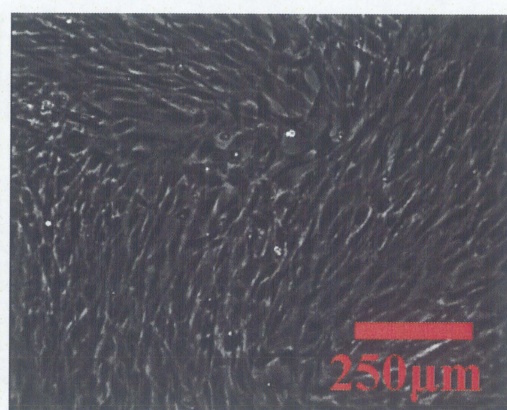
添加前

6h



12h

24h



(c)



図 3-12 Na_2CO_3 による細胞毒性
(a) 8.7mM, (b) 43.3mM, (c) 86.3mM

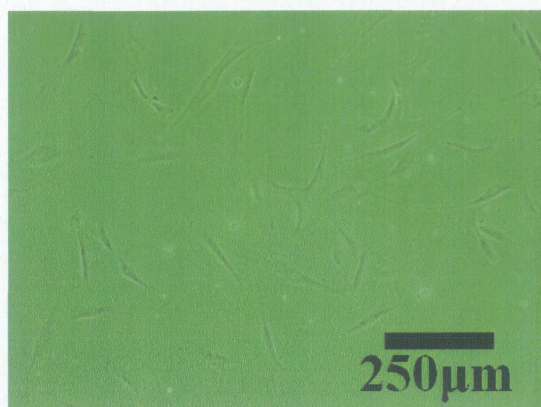
表 3-3 各添加物と各濃度での細胞毒性

添加物	濃度(mM)	細胞毒性
Na ₂ CO ₃	8.7	なし
	43.3	なし
	86.3	あり
TEA	8.7	あり
	43.3	あり
	86.3	あり

(a)

0h

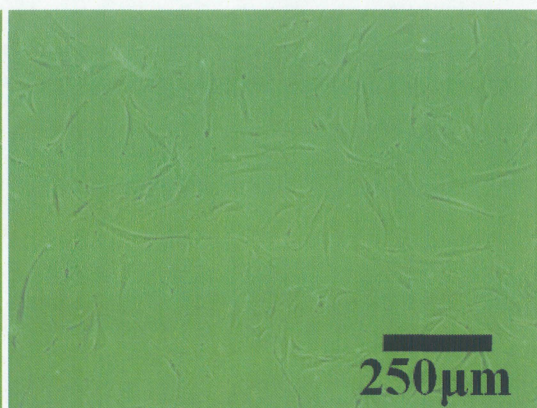
48h



(b)

添加前

48h



(c)

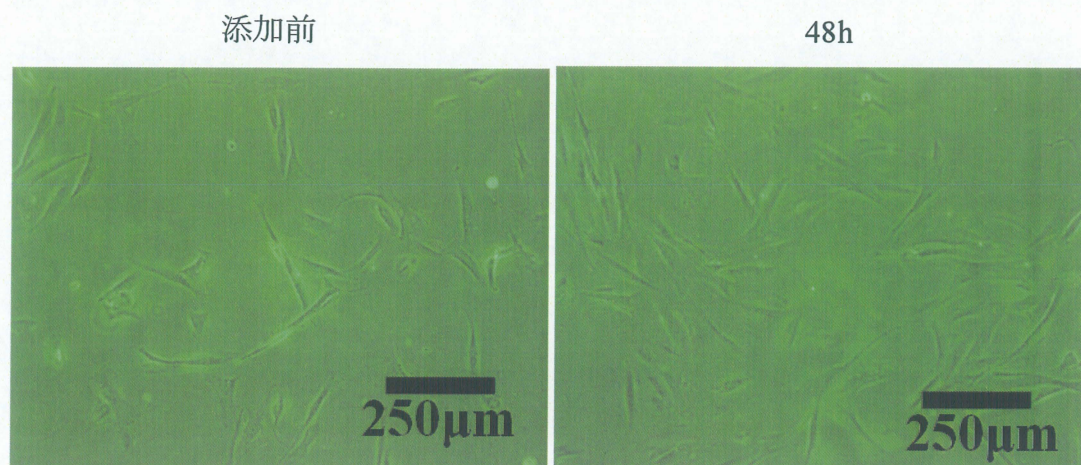
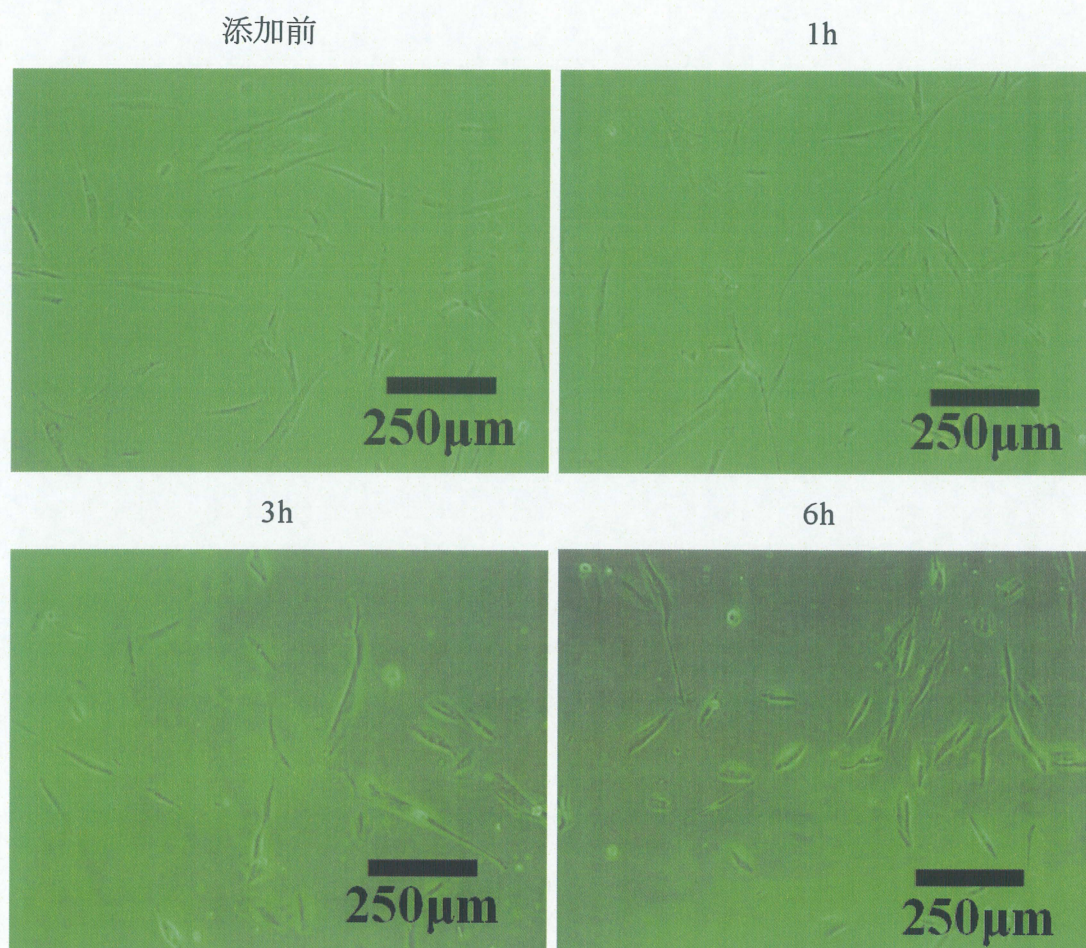


図 3-13 Dode-DSP の毒性
(a) control, (b) 1mM, (c) 0.1mM

DSP 86.3 mM



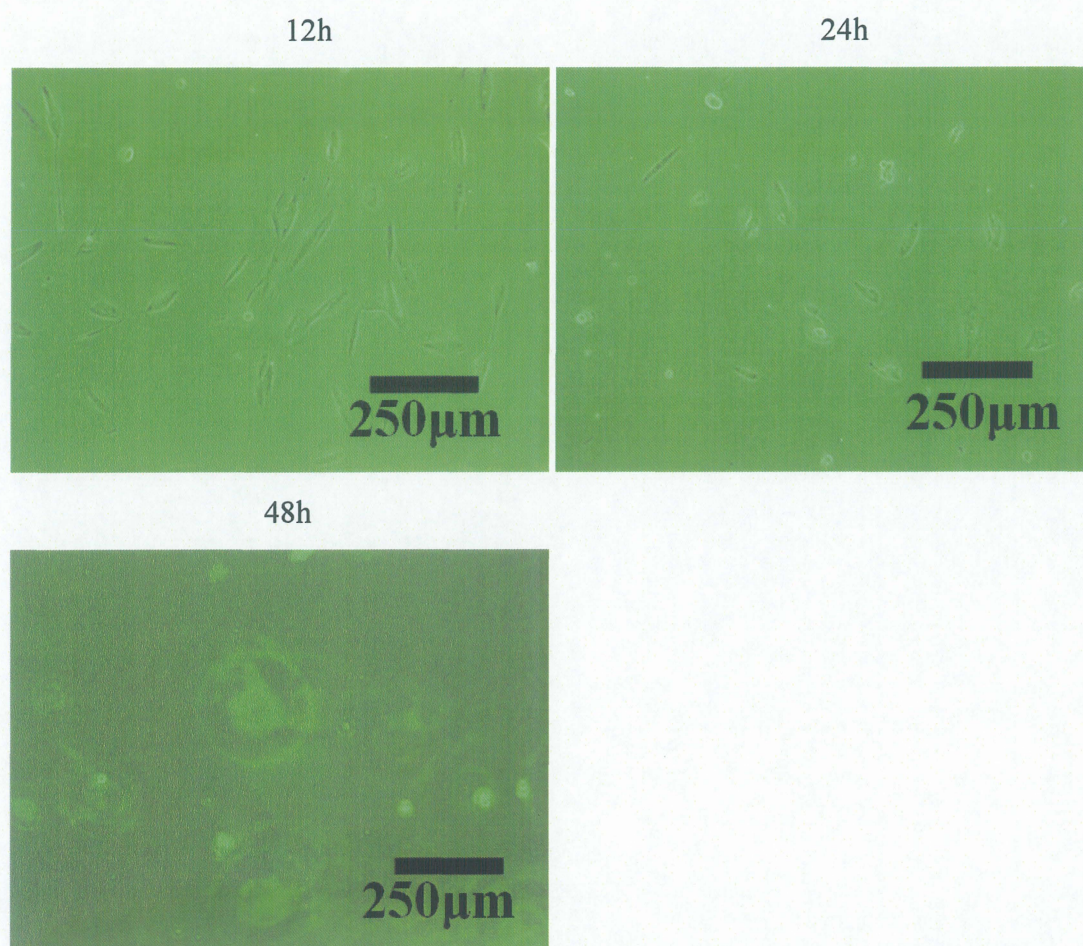


図 3-14 DSP による細胞毒性

表 3-4 Dode-DSP 濃度による細胞毒性

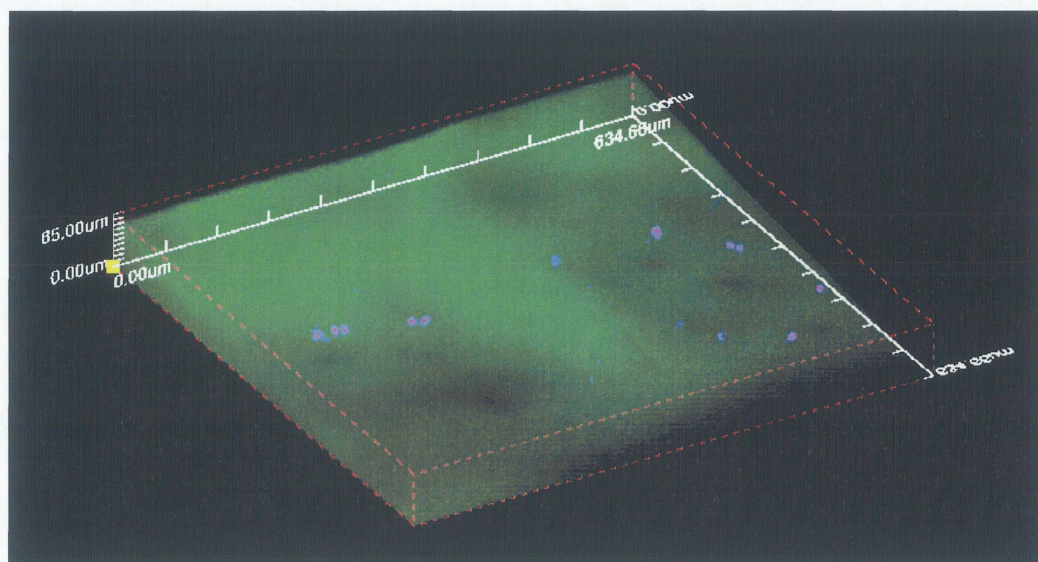
添加物	濃度(mM)	細胞毒性
Dode-DSP	86.3	観察不可
	10	観察不可
	1	なし
	0.1	なし
DSP	173	あり

3-3-2 免疫蛍光染色によるエラスチンゲル上細胞の観察

エラスチンゲルを架橋倍率 3 倍、架橋倍率 3 倍+トレハロース添加、架橋倍率 0.5 倍で作製後、ゲル上に細胞を播種し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。緑色がエラスチンゲル、赤色が細胞核、青色が α -SMA である。架橋倍率 3 倍のゲル上に播種した細胞は、接着している細胞数が少なかった。また、分化マーカーである α -SMA の発現が見られたため、収縮型だと考えられる(図 3-15, a)。トレハロースを添加した架橋倍率 3 倍のゲル上から細胞を播種した。トレハロース添加のゲル上では細胞は固まって存在しており、 α -SMA の発現も見られた(図 3-16)。架橋倍率 0.5 倍のゲル上では、細胞は非常に多く接着しており、固まって存在した。 α -SMA の発現量は低くかったが、発現は確認した(図 3-17)。

トレハロース添加による細胞の存在位置への影響を観察した。架橋倍率 3 倍ゲル(図 3-15, b)とトレハロース添加ゲル(図 3-16, b)で比較すると、架橋倍率 3 倍ゲルではゲル表面に多く存在し、トレハロース添加ゲルでは表面より少し内部に存在した。(図 3-18)

(a)



(b)

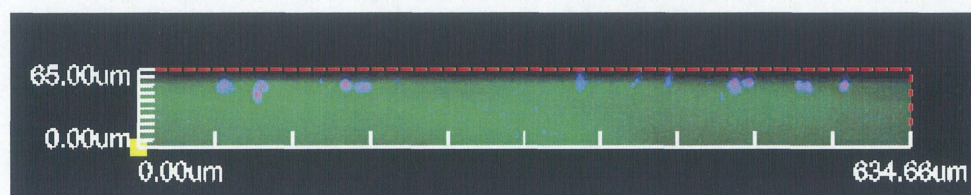
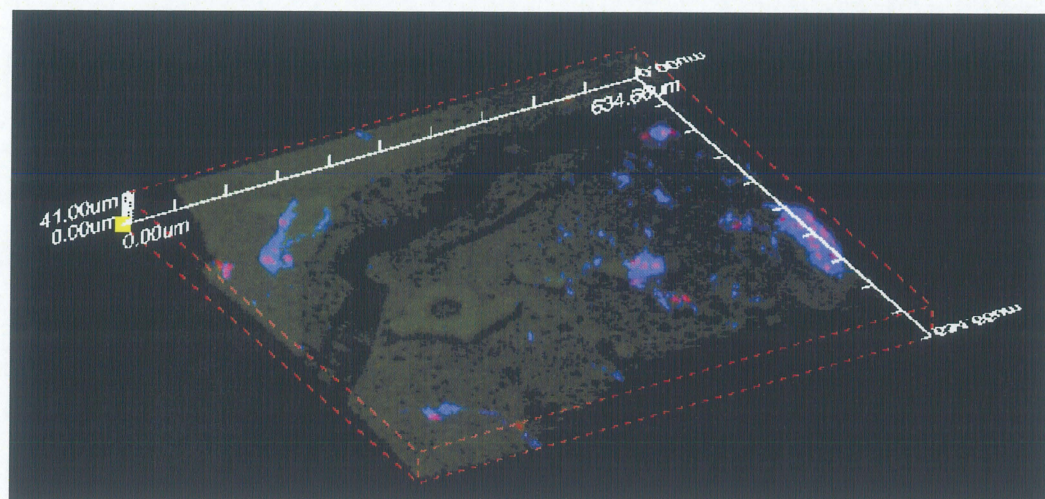


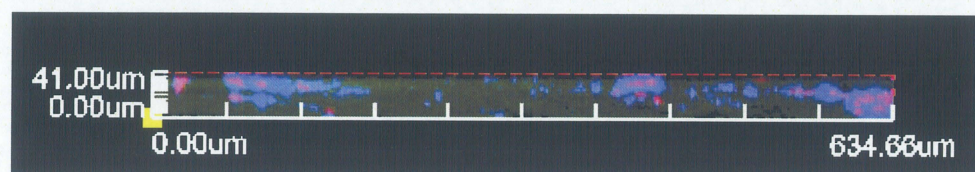
図 3-15 架橋倍率 3 倍ゲル上の細胞

(a) 3D, (b) Y-Z 平面

(a)



(b)



(図 3-16) trehalose 添加ゲル上の細胞
(a) 3D, (b)Y-Z 平面

(a)

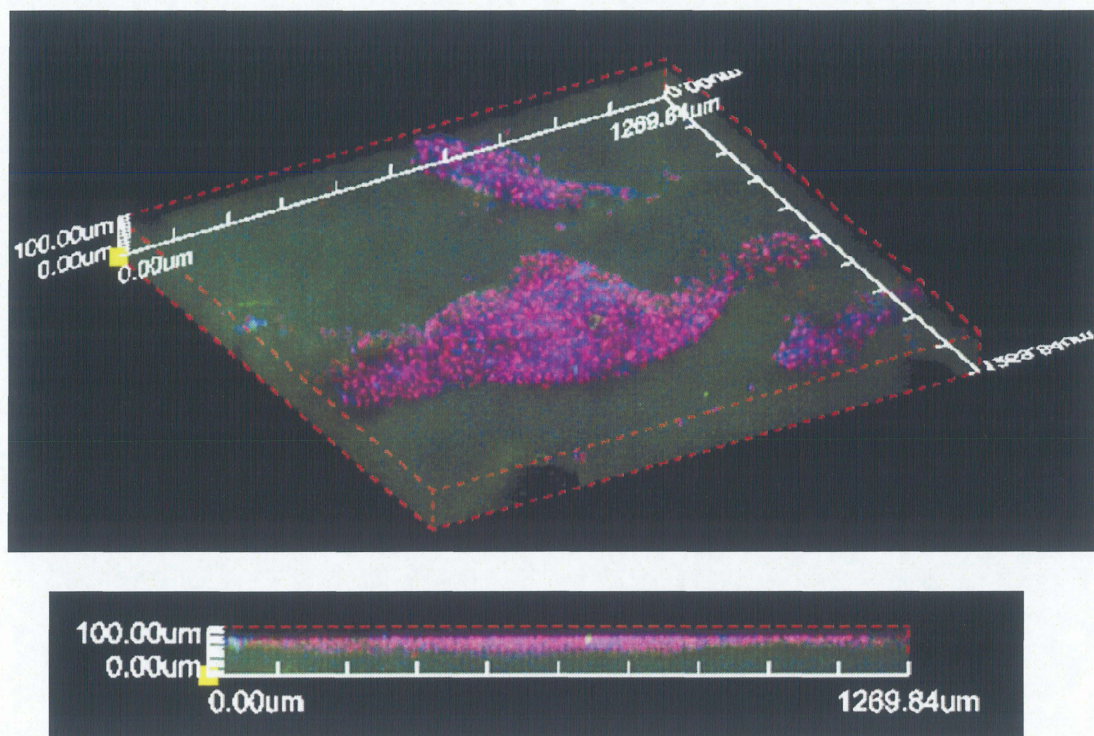


図 3-17 架橋倍率 0.5 倍ゲル上の細胞
(a) 3D, (b) Y-Z 平面

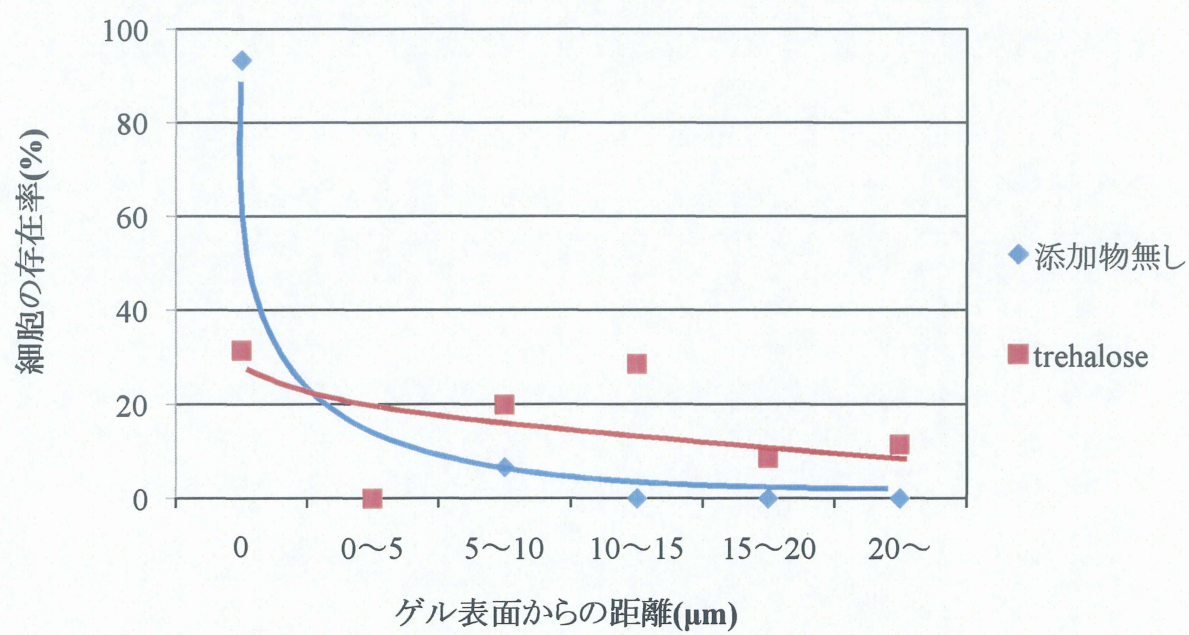


図 3-18 細胞の存在位置の割合

3-3-3 エラスチンゲル下細胞の BrdU 細胞増殖試験

96well プレートに播種した細胞の上から、各架橋倍率になるように調製したゲルを覆うように添加したものを1日後、3日後にBrdU細胞増殖試験を行った。培養中はゲルとして存在したが、BrdU細胞増殖試験中の洗浄で、架橋倍率0.05倍、0.1倍のゲルは溶解、ゲルとして残ったのは架橋倍率3倍、0.5倍であった。controlは細胞のみで培養した。controlを含め全ての条件で3日目に増殖能が下がった。また、架橋倍率0.05倍、0.1倍ではcontrolと大きな差はなかった。

架橋倍率0.5倍では増殖能は少し下がったが、ゲルのみの値よりは高い値となったので細胞の生存を示した。架橋倍率3倍の値は細胞の有無に関係なく異常に高く、標準偏差も大きかった(図3-19)。

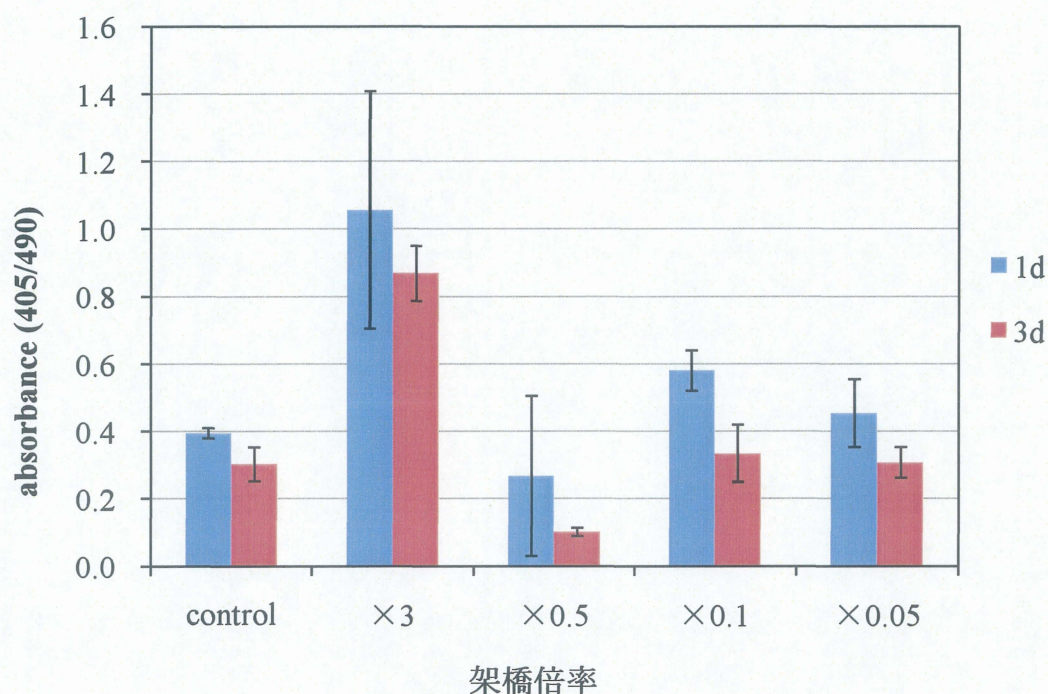


図 3-19 ゲル下細胞の増殖能

3-3-4 エラスチンゲル包埋培養細胞の BrdU 細胞増殖試験

架橋倍率 3 倍と 0.5 倍に調製したエラスチンゲル溶液に細胞懸濁液を加え、ゲル化し、細胞をゲルに包埋した状態で培養し、1 日後、3 日後に BrdU 細胞増殖試験を行った。

架橋倍率 0.5 倍では、1 日目、3 日目共にゲルのみよりも高い値となり、3 日目の方がより高い値を示した。架橋倍率 3 倍では、高い値と低い値の差が大きく、標準偏差も大きくなった(図 3-20)。

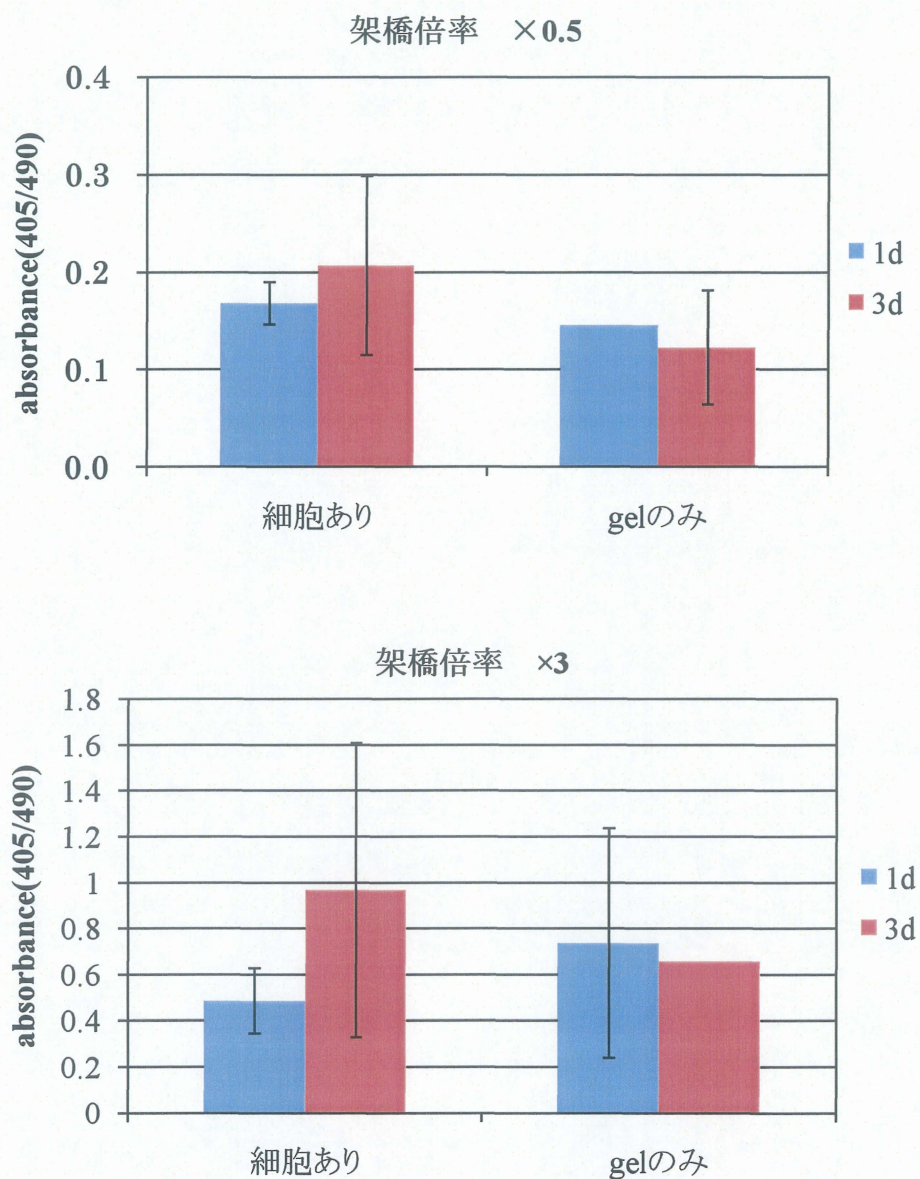


図 3-20 ゲル包埋培養細胞の増殖能

3-4 エラスチンゲル伸展培養

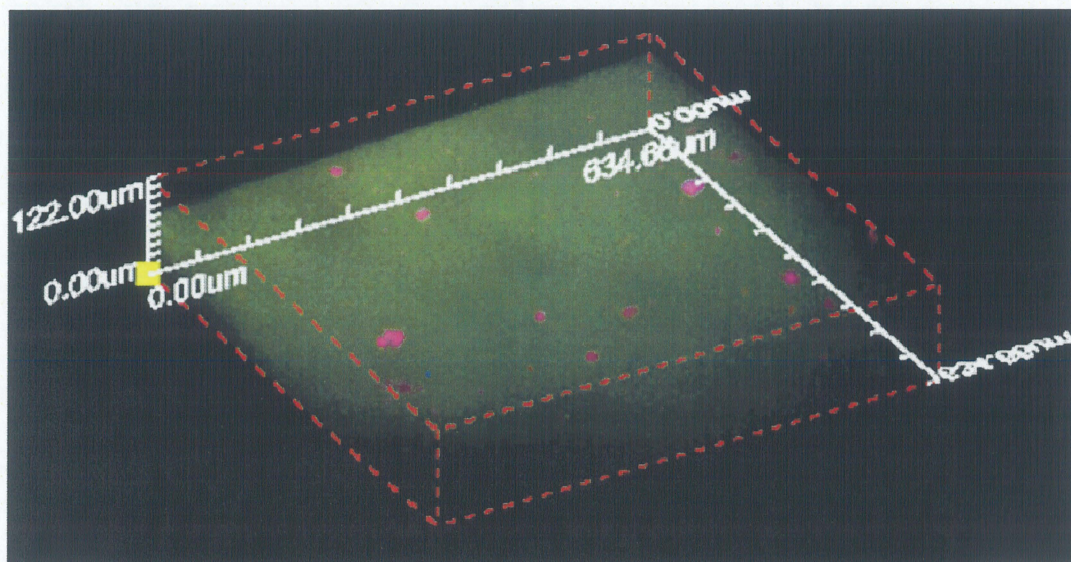
細胞を包埋したエラスチンゲルを架橋倍率 0.5 倍、3 倍で作製し、48 時間培養後、免疫蛍光染色で観察した。架橋倍率 3 倍ではゲル内の細胞を観察しにくかったので、200 倍で撮影した。全体的に観察できるゲル内の細胞数は少なく、 α -SMA はほとんど発現していなかった(図 3-21)。

架橋倍率 0.5 倍ではゲル内に細胞は多く存在しており、 α -SMA は観察されたが、部分的には細胞数が少なく、 α -SMA の発現量が低かった(図 3-22)。

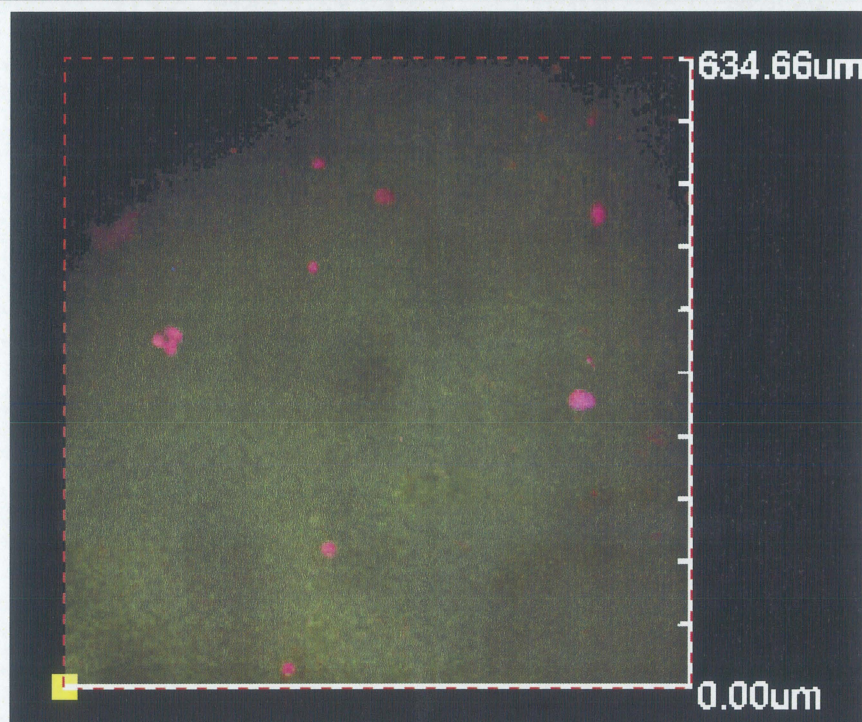
架橋倍率 0.5 倍で作製した細胞包埋エラスチンゲルを 24 時間インキュベート後、24 時間伸展し、免疫蛍光染色で観察した。ゲル内の細胞は観察し易く、細胞はゲル内に多数存在していた。ほとんどの細胞が α -SMA を発現していた(図 3-23)。

細胞形態は静置では少し伸展しているものもあるが、X-Y 平面で見ると丸く、小さくなっていた(図 3-24)。伸展では X-Y 平面で見ると静置よりも小さく、丸い形態をしていた(図 3-25)。しかし、Z 軸方向に観察すると、 α -SMA が伸びており、X-Y 平面で α -SMA の広がっている幅を横幅、Z 軸方向に伸びている長さを縦幅として image J を用いて測定し、縦を横で割った値から配向性を観察した(図 3-26)。静置と比較し、伸展培養を行った場合、Z 軸方向に α -SMA が伸びているのが確認され、伸展による細胞の配向が示唆された(図 3-27)。さらに、図 3-27 の結果の縦横比を図示化すると、細胞形態の変化が見られた(図 3-28)。

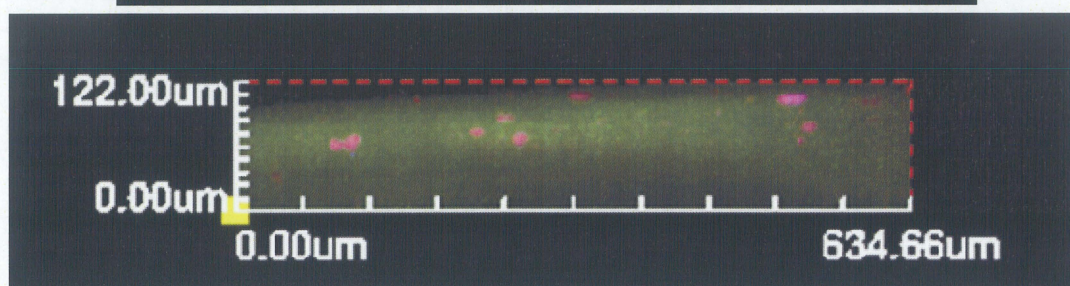
[i] (a)



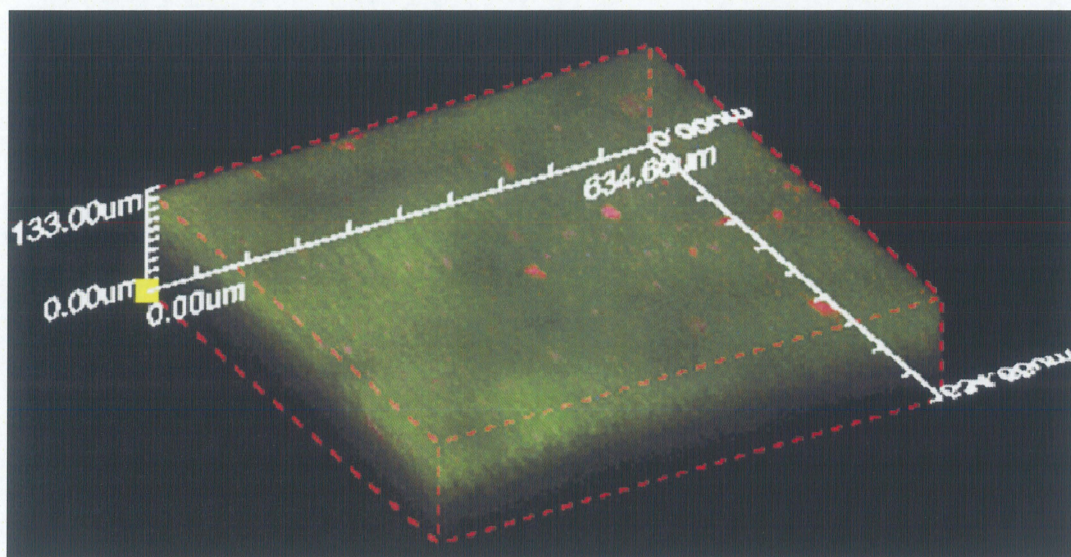
(b)



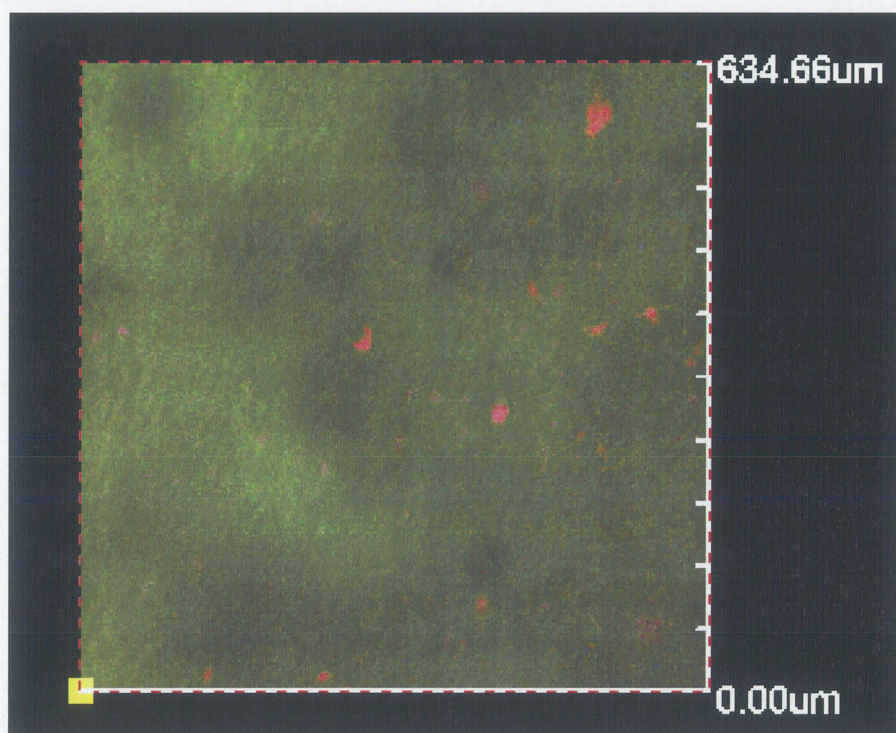
(c)



[ii] (a)



(b)



(c)

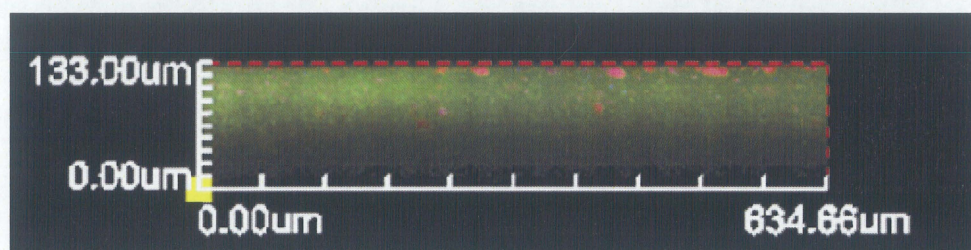
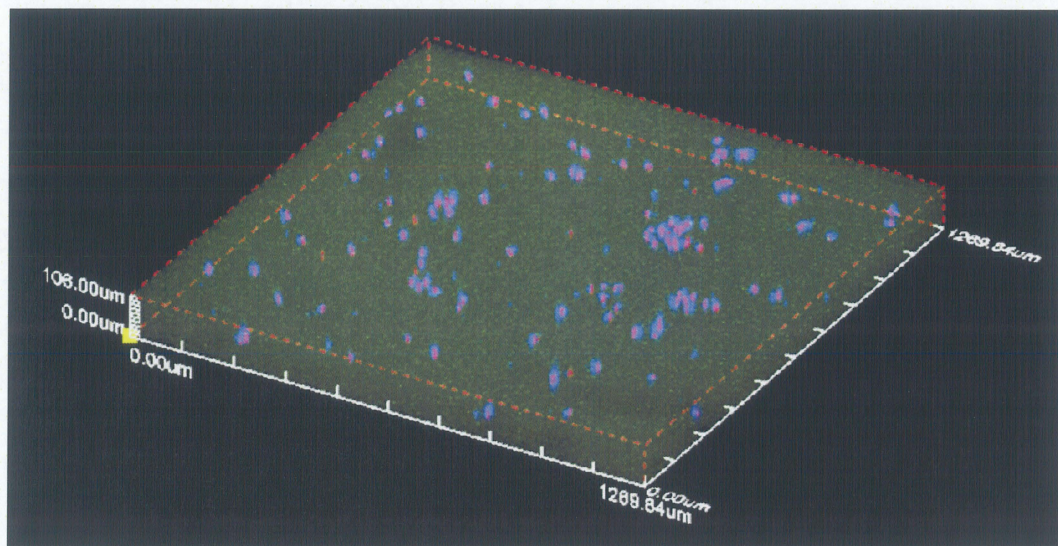
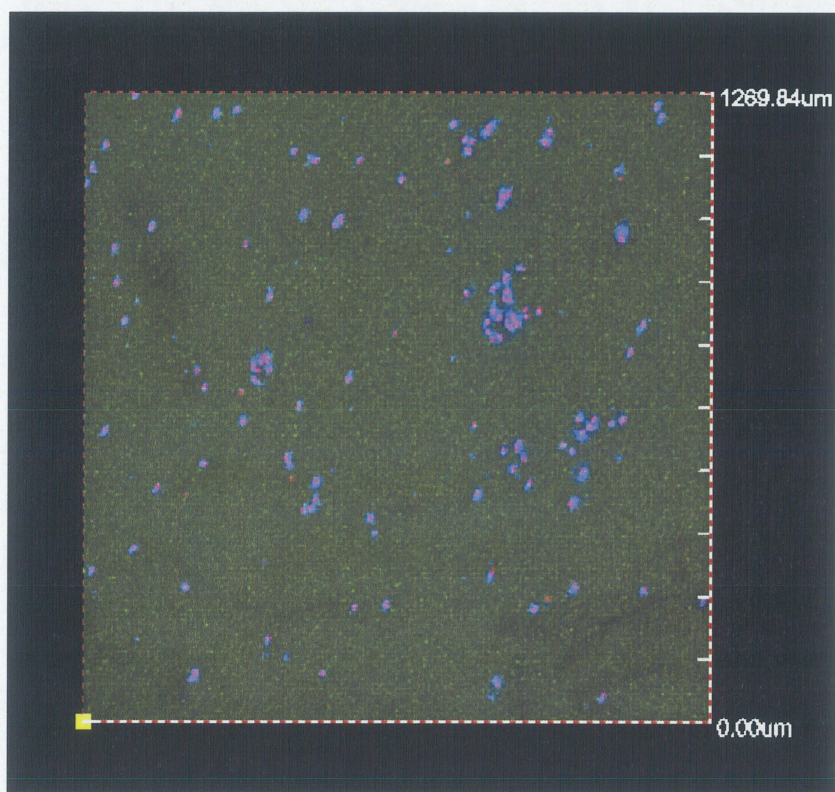


図 3-21 架橋倍率 3 倍の細胞包埋エラスチンゲル培養($\times 200$)
[i], [ii] は任意の 2ヶ所、(a) 3D, (b) X-Y 平面, (c) Y-Z 平面

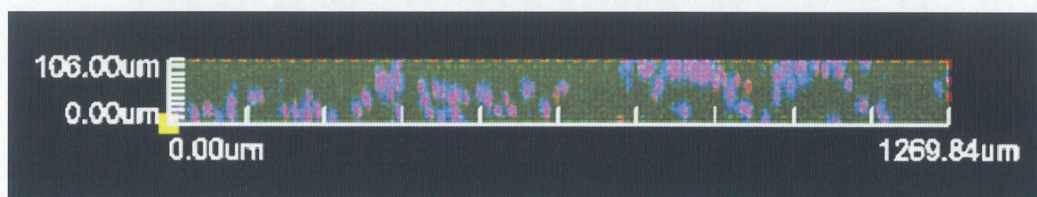
[i] (a)



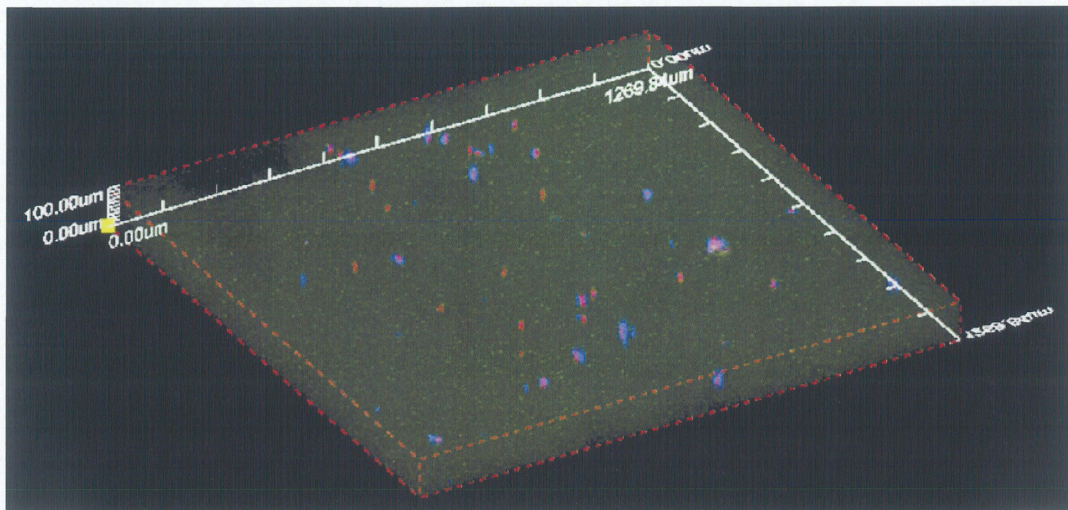
(b)



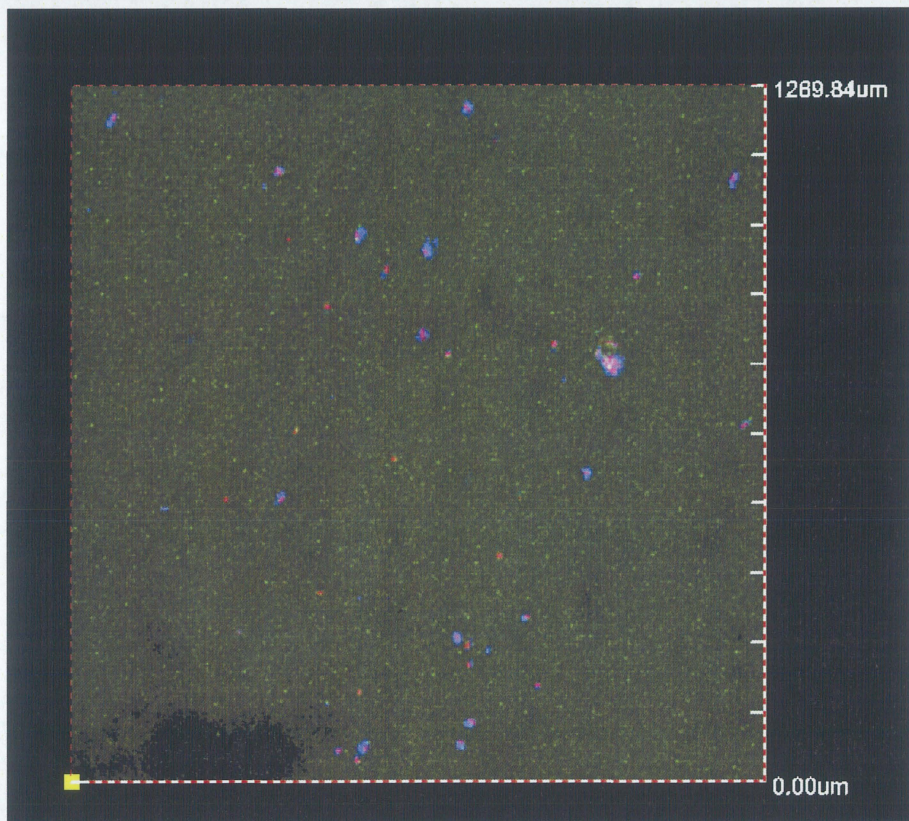
(c)



[ii] (a)



(b)



(c)

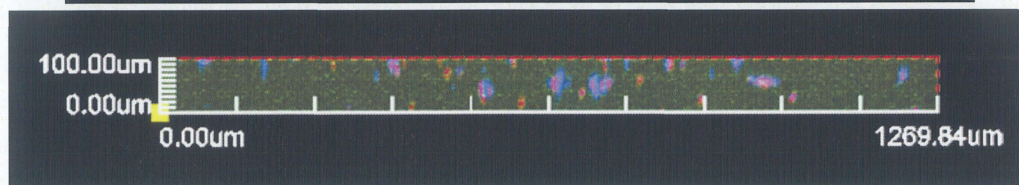
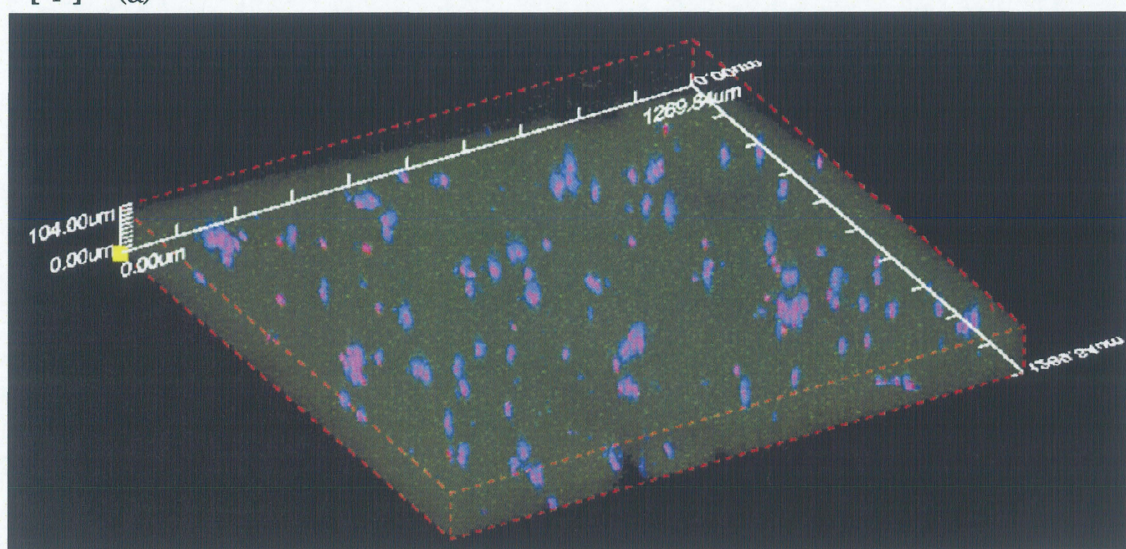
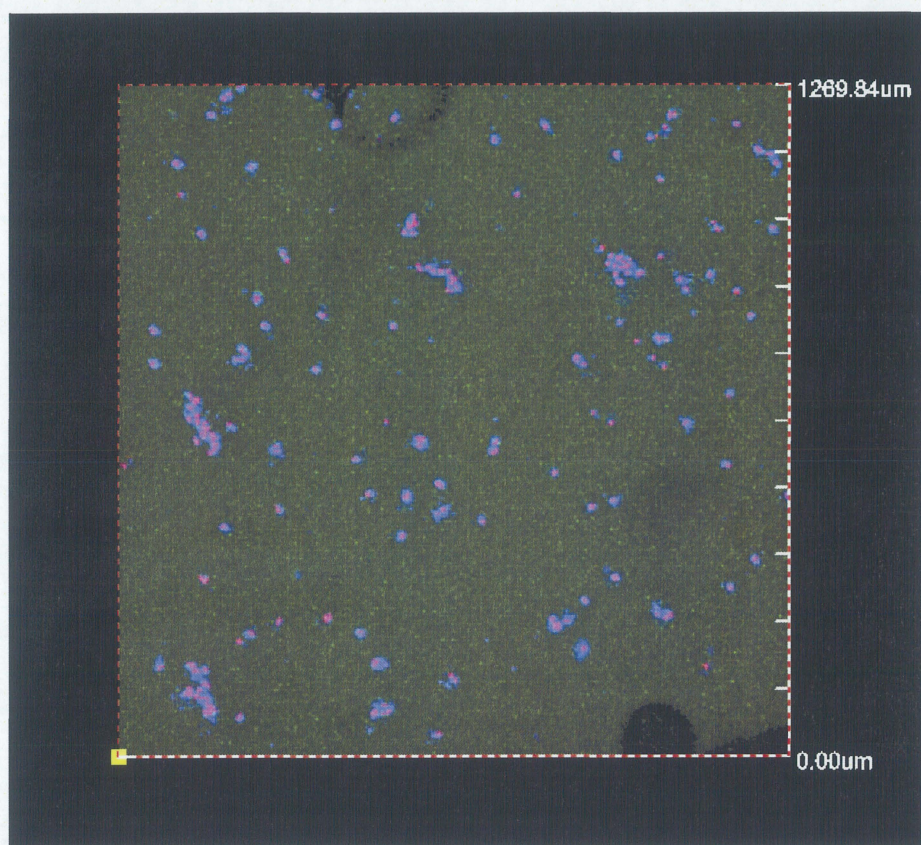


図 3-22 架橋倍率 0.5 倍の細胞包埋エラスチンゲル培養($\times 100$)
[i], [ii]は任意の2ヶ所、(a) 3D, (b) X-Y 平面, (c) Y-Z 平面

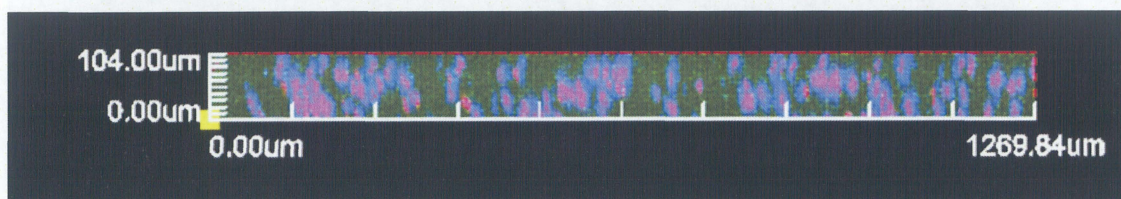
[i] (a)



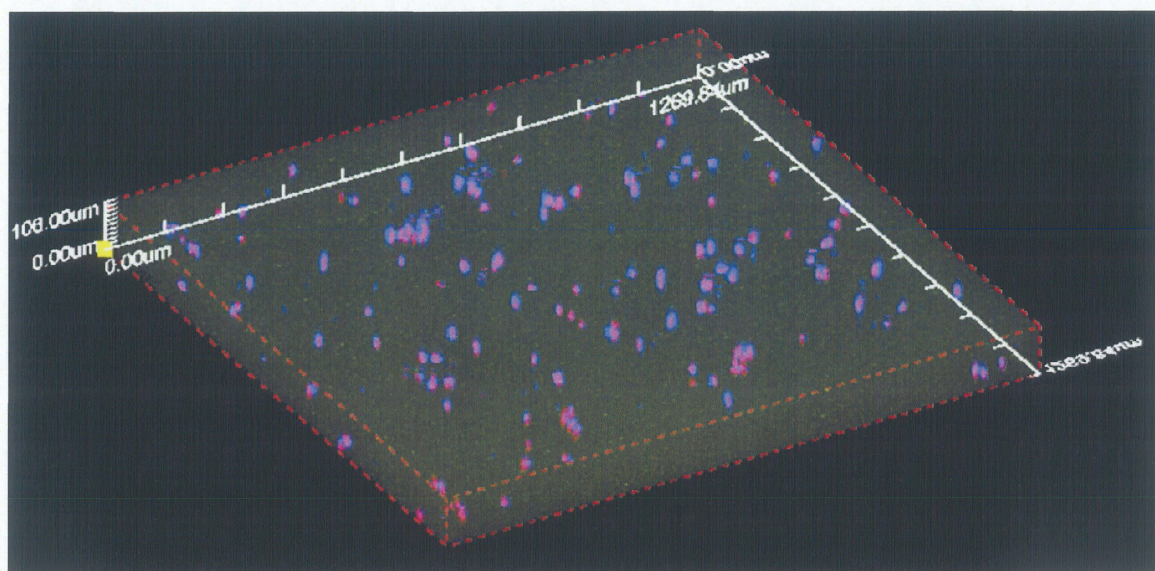
(b)



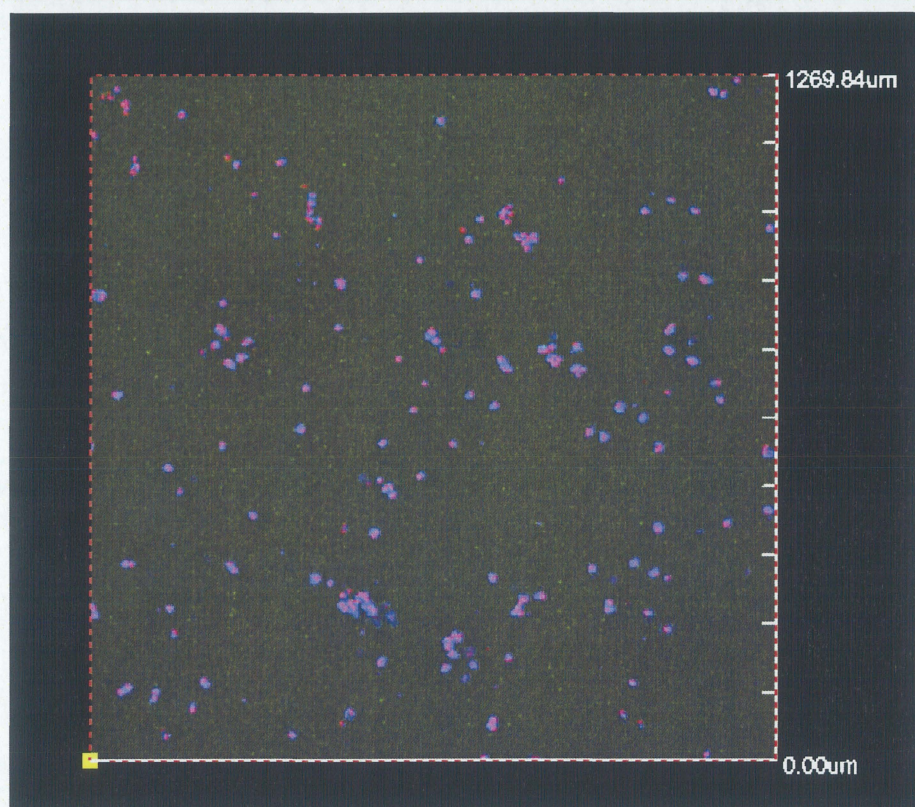
(c)



[ii] (a)



(b)



(c)

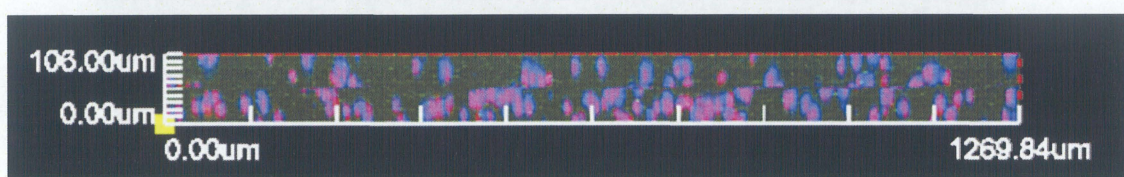


図 3-23 架橋倍率 0.5 倍の細胞包埋エラスチンゲルの伸展培養($\times 100$)

[i], [ii]は任意の2ヶ所、(a) 3D, (b) X-Y 平面, (c) Y-Z 平面

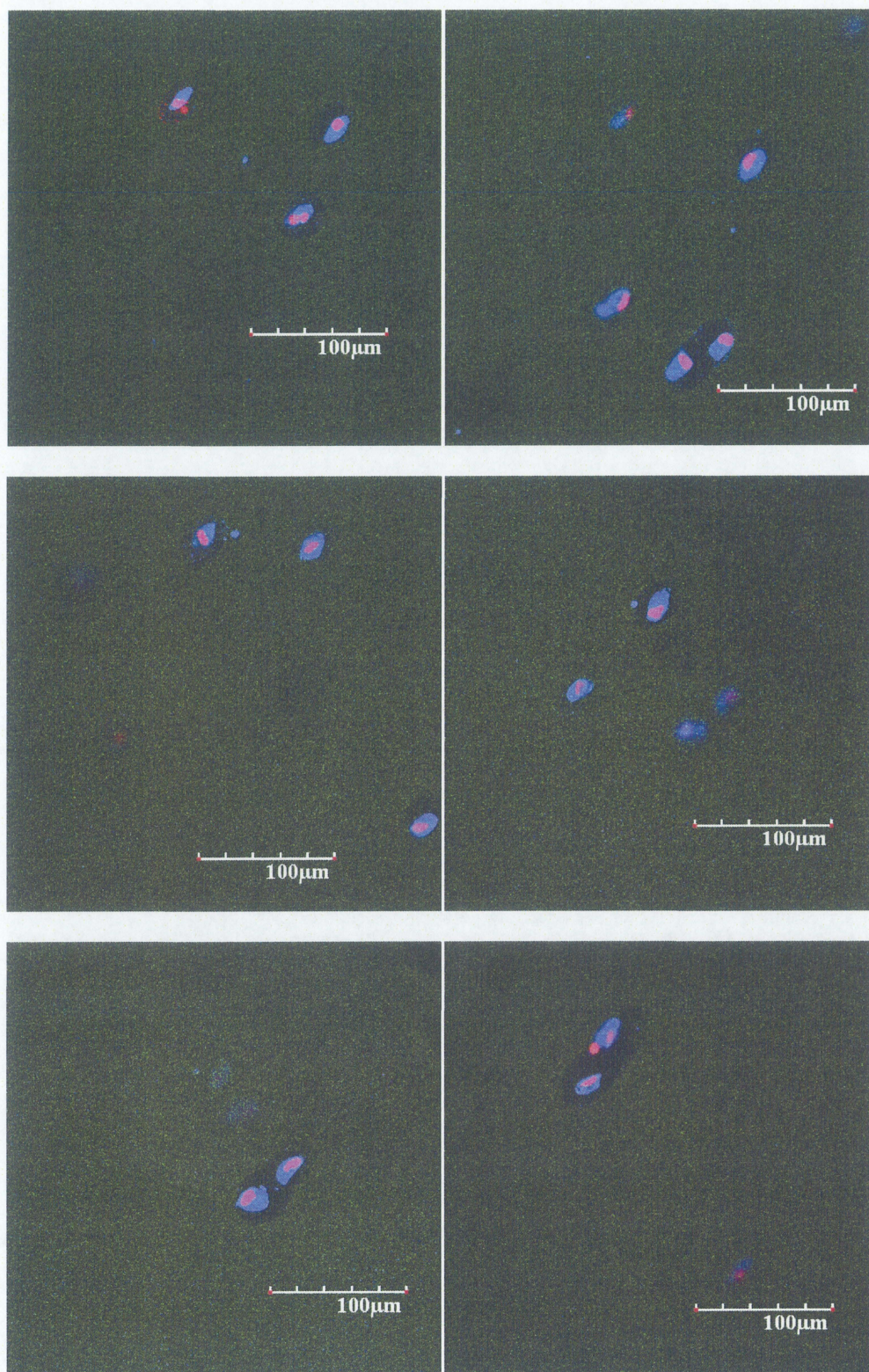


図 3-24 エラスチンゲル内の細胞形態(×400)
(任意の 6 ヶ所)

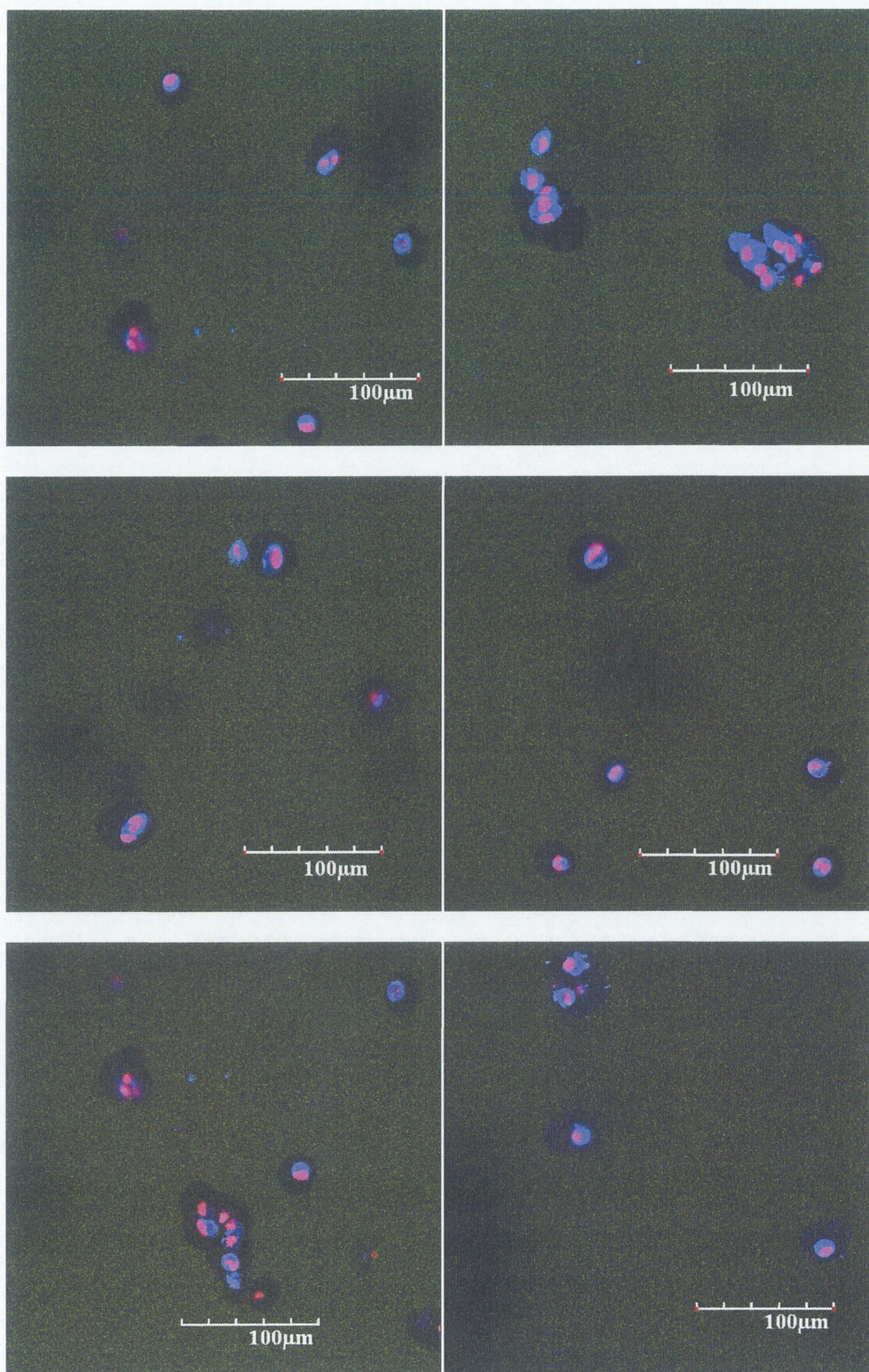


図 3-25 伸展培養した細胞形態(×400)
(任意の6ヶ所)

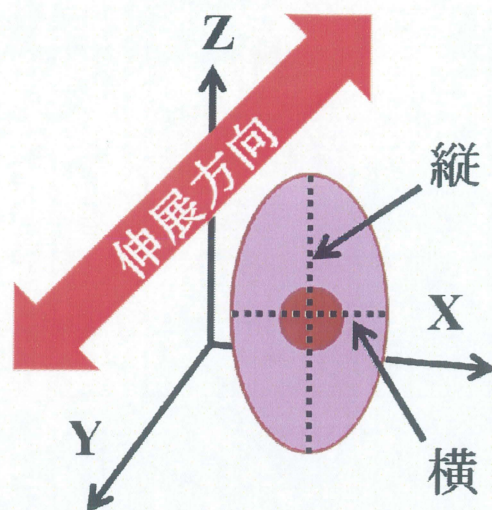


図 3-26 伸展と細胞の方向

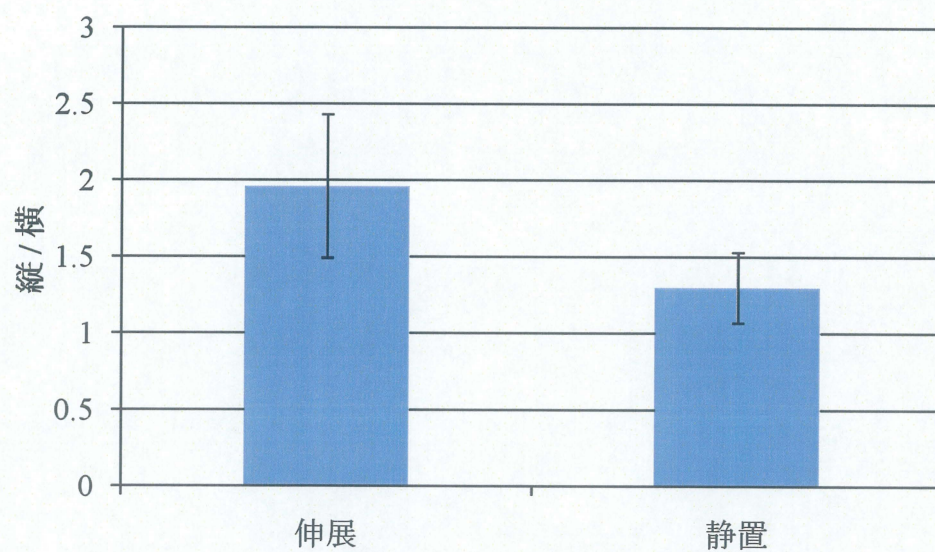


図 3-27 細胞の配向性

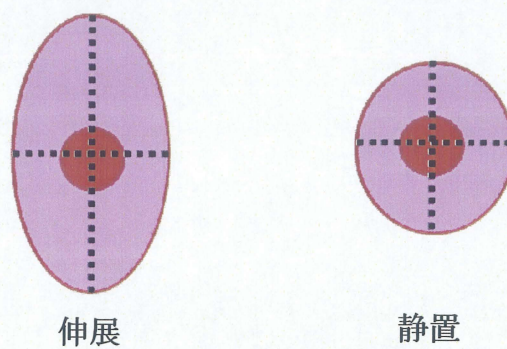


図 3-28 細胞の縦横比

4. 考察

4-1 エラスチン分子の相互作用による凝集温度への影響

まず、エラスチン A~E の凝集温度測定の結果について考察する(図 3-1)。エラスチン分子が凝集する原因は水素結合、疎水性相互作用、静電性相互作用、ファンデルワールス力などの相互作用による影響だと考えられる。エラスチン A の数平均分子量はおよそ 25kDa、エラスチン E はおよそ 10kDa であるため、分子量の大きいエラスチン A は分子内で相互作用が生じ易く、反対に分子量の小さいエラスチン E は分子間での相互作用が生じ易くなる。それゆえ、エラスチン A は凝集温度が低く、エラスチン E は凝集温度が高いと考えられる。

また、エラスチン溶液はエラスチン濃度が高くなるにつれて凝集温度が上昇した(図 3-2)。これは、濃度が高くなることで分子密度が上がり、エラスチン分子内ではたらいていた相互作用が分子間ではたらくようになったためだと考えられる。(図 4-1)

pH による影響は、pH が高くなると凝集温度は上昇した(図 3-3)。塩基性条件では、エラスチン分子内の酸性アミノ酸であるアスパラギン酸、グルタミン酸のカルボキシル基が解離し、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 NH_3^+ から H^+ が脱離し、 NH_2 となることでエラスチン分子全体が負に帯電する。それゆえ、マイナスの斥力が働きエラスチンの会合を妨げたため凝集温度が上昇したと考えられる。(図 4-2)⁽¹⁰⁾

トロポエラスチン溶液の pH を pH 5 から pH 9 まで上昇させた時、トロポエラスチン分子の相互作用が増加し、会合を促進したという報告もされている。⁽¹¹⁾

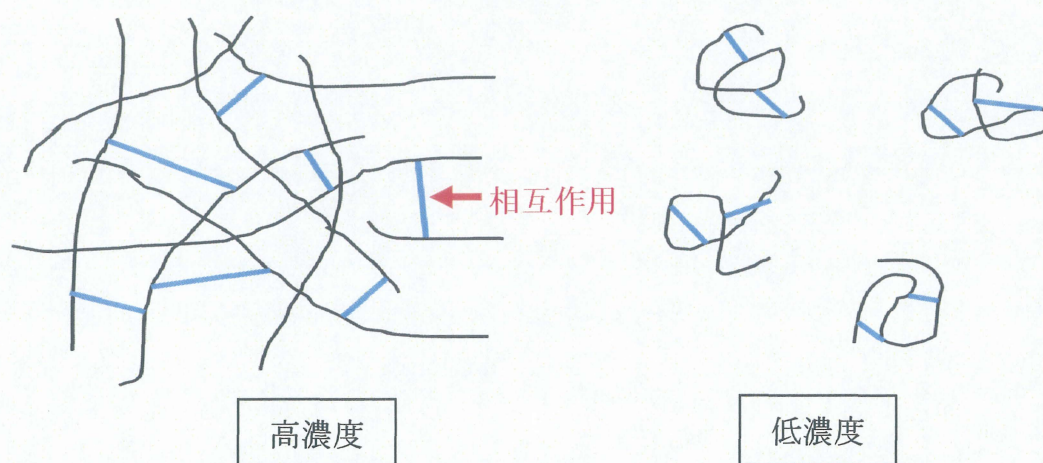


図 4-1 濃度による相互作用の違い

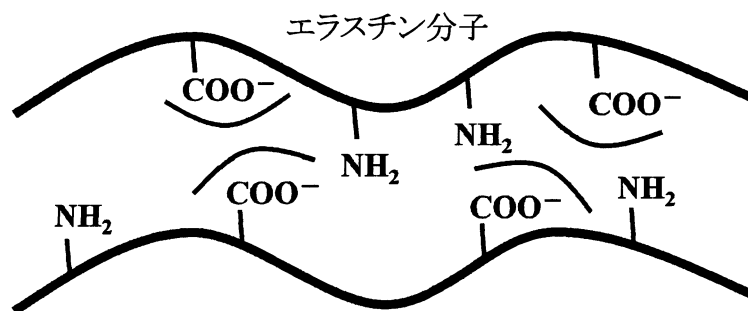


図 4-2 負に帯電したエラスチン分子

4-2 エラスチンゲル作製

4-2-1 ゲル化時間の変化

エラスチン溶液に Na_2CO_3 と TEA を添加して pH が上昇し(表 3-2)、ゲル化時間が短縮した(図 3-5)。エラスチン分子はリシン残基のアミノ基を、架橋剤はエステル部分を架橋部位としている(図 4-3)。それゆえ塩基性の場合、エラスチン分子のリシン残基の NH_3^+ から H^+ が脱離し、 NH_2 となり非共有電子対を持つようになるため、架橋反応し易くなったと考えられる。また、架橋剤である Dode-DSP はゲル化促進剤として用いた TEA と Na_2CO_3 が求核剤となり、エステルの炭素に攻撃し、電子の移動が生じて架橋反応し易くなったと考えられる(図 4-4)。

架橋倍率が高いほどゲル化時間は短縮された(図 3-6)。Dode-DSP の濃度が高いほど、エラスチン分子の架橋部位と接触する確率が増加し、架橋反応し易くなったからだと考えられる。また、架橋倍率が低いと架橋密度も低下する。それゆえ、ゲル内の空間の割合が高くなり、細胞が存在するための場所を与えることができる。しかし、ゲルは架橋密度が低下すると、膨潤率が増加することが様々な材料のゲルで報告されている。(12,13,14)よって、エラスチンゲルも同様に架橋密度の低下により膨潤率が増加すると考えられる。

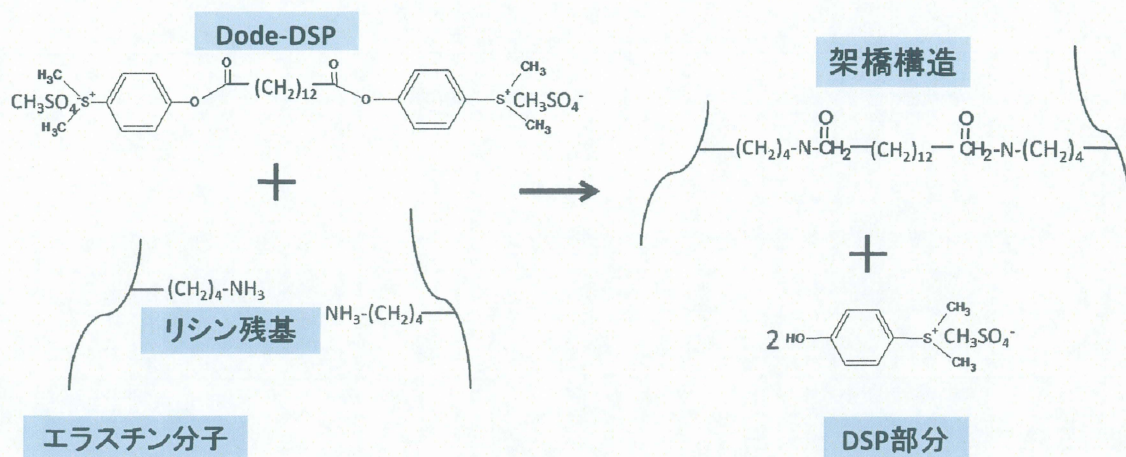


図 4-3 エラスチンゲルの架橋構造

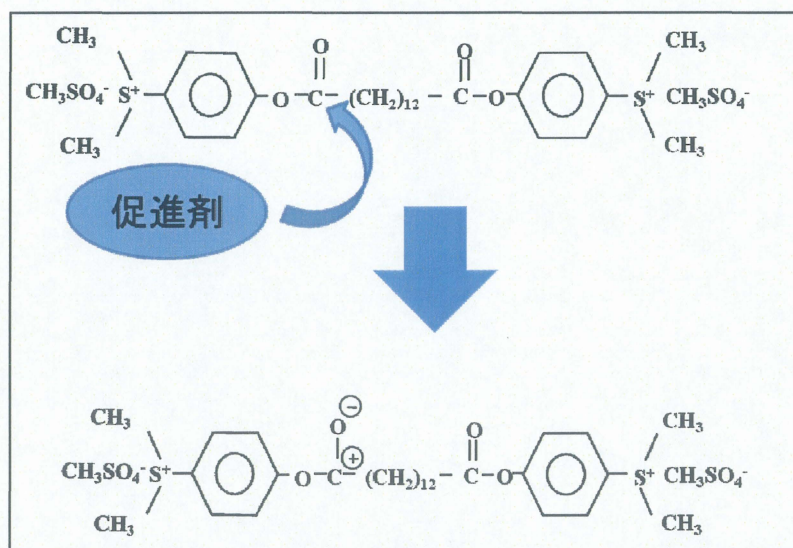


図 4-4 Dode-DSP

4-2-2 エラスチンゲルの微細構造変化

エラスチンゲルに HA またはトレハロースを添加したが、空隙率に変化は無かった(図 3-7)。エラスチンゲル内の孔は溶媒で満たされた部分である。今回は溶媒量を変化させずに、HA とトレハロースを添加したので、エラスチンゲル内の溶媒が占める体積は変化しなかったと考えられる。

エラスチンゲルは多孔性であり、エラスチンゲル内の孔の平均孔径は、HA 添加は濃度が高くなるほど大きくなり、トレハロース添加はトレハロース濃度が 0.3mM までは小さくなり、より高い濃度にする大きくなった(図 3-8)。

エラスチンゲルが多孔性なのは、DSP 架橋エラスチンゲルは局所架橋構造をとるため、分子内相互作用を阻害せず、エラスチン分子が凝集したままゲル化するからだと考えられる(図 4-5)⁽¹⁵⁾。

HA はグルクロン酸と N-アセチルグルコサミンの二糖類が一様な繰り返し構造から成る線形グリコサミノグリカンである(図 4-6, a)。生理的条件下では隣接した糖単位に水素結合とカルボキシル基の間の斥力により拡張したランダムコイルを形成する。通常は 2000~25000 の二糖類から成り、分子量は $10^6 \sim 10^7$ Da である。希薄溶液においては非常に高い溶解性があるが、濃度が上昇すると、個々の分子が絡まり、連続的な網目を形成する。⁽¹⁶⁾ 溶液中では負電荷を帯びており、水分子を引き付けるため高い保水性がある。また、HA 添加し、その濃度によってフィブリンゲル内の平均孔径が大きくなったという報告もされている。⁽¹⁷⁾ それゆえ、本研究においても、溶液中で大きな体積を占めている HA 分子が水分子を引き付けるため、ゲル内の孔径が大きくなったと考えられる(図 4-5)。また、HA 濃度を上昇し過ぎると局所的に HA 分子の網目を形成したため、不均一な構造となったと考えられる(図 3-9,10)。

トレハロースは α -グルコース 2 分子が α -1,1-グリコシド結合してできた二糖の一種である(図 4-6, b)。タンパク質や細胞膜を乾燥や凍結などの物理的ストレスから守る働きが注目されている。トレハロースの生体保護効果として次の二つのメカニズムが提案されているが、いずれも決定的な証拠をつかめていない。

- 1、トレハロースが直接、水の代わりにタンパク質分子に水素結合して水のように振舞う(水置換説)
- 2、トレハロースがガラス状になり、そのガラス構造によって、タンパク質をカプセルに包むようにして分子構造を歪まないようにする。(ガラス状態仮説)

さらに、トレハロースの特有な水和特性も十分に解明されていない。⁽¹⁸⁾ 図 3-8、図 3-9 の結果を、水置換説を基に考察すると、エラスチン分子にトレハロースが直接水素結合してそれぞれが水分子と凝集体を形成したため、多量の孔が生じ、それらが貫通したと考えられる。また、低分子のトレハロースは占める体積が小さいため、水分子との凝集体の体積も小さく、平均孔径は減少し、濃度を高くした場合では、凝集体の大きさも増加し、孔径が増加したと考えられる(図 4-7)。

以上より、エラスチンゲル微細構造は添加物で制御できると示唆された。

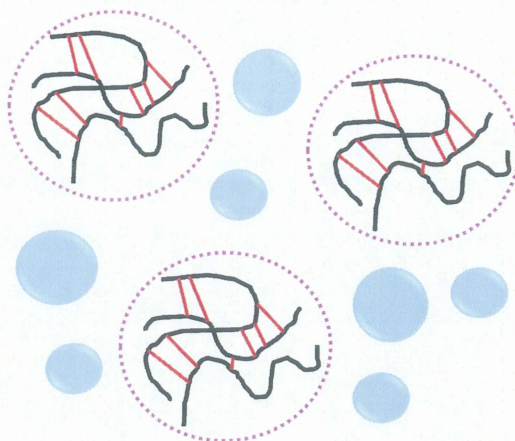


図 4-5 ゲル内相分離⁽⁹⁾

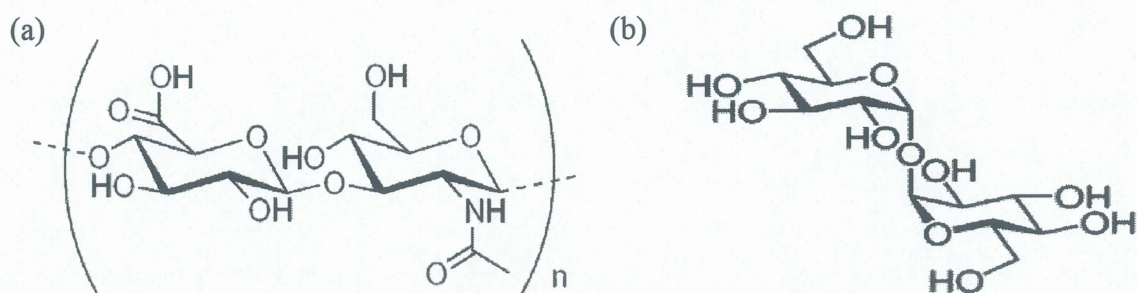


図 4-6 構造式 (a) HA, (b) trehalose

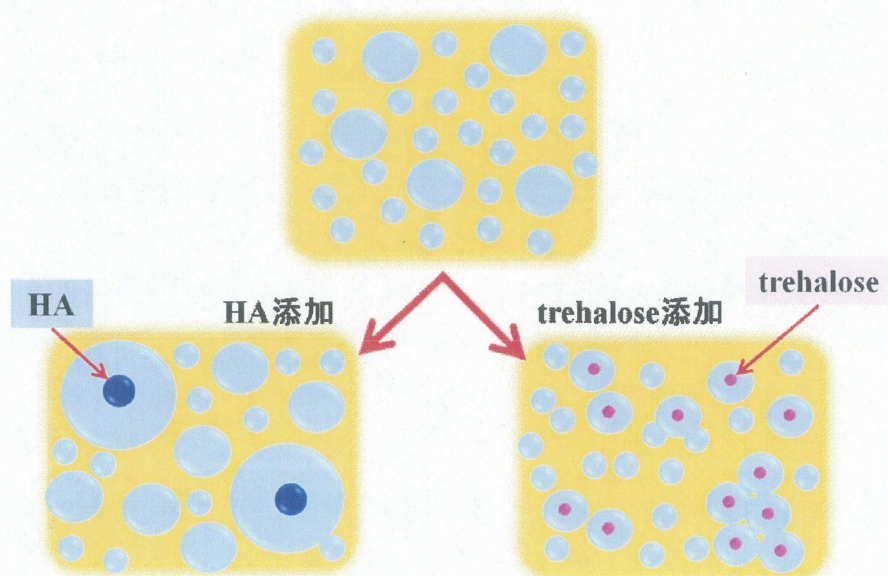


図 4-7 ゲル内微細構造変化について

4-3 ヒト大動脈血管平滑筋細胞に対するエラスチンゲルの影響

4-3-1 エラスチンゲル作製試薬による細胞への影響

エラスチンゲル作製試薬である架橋剤の Dode-DSP とゲル化促進剤の Na_2CO_3 、TEA の細胞毒性の結果について考察する(表 3-3)。

TEA は常温では強アンモニア臭を持つ無色で揮発性のある液体である。TEA は危険有害性があることは知られている。そのため、pHを上昇するだけでなく、それ自体に毒性があるので、低濃度であっても細胞毒性があり(図 3-11)、ゲル化促進剤としては使用できない。

ゲル化促進剤の Na_2CO_3 は溶解しても以下の反応をし、人体に毒性のある物質は生成しない。

1. $\text{Na}_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{Na}^+ + \text{CO}_3^{2-}$
2. $\text{HCO}_3^- \longleftrightarrow \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-}$
3. $\text{CO}_3^{2-} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{OH}^-$

それゆえ、低濃度であれば細胞毒性はない(図 3-12)。しかし、強塩基なので濃度が高くなると pHを上昇し過ぎるため、細胞に毒性を与えたと考えられる。

Dode-DSP は低濃度であれば細胞増殖も確認でき、細胞毒性はなかった(表 3-4、図 3-13)。しかし、Dode-DSP の濃度が高いと白濁し、位相差顕微鏡では観察できなかった。以前の研究では 1mM 以上で白濁し、正確な値を測定できなかった。⁽¹⁹⁾ 架橋倍率 3 倍でゲルを作製する場合に含まれる DSP を細胞に暴露したら、細胞毒性を示した(図 3-15)。Dode-DSP には DSP が二倍量含まれる(図 4-3)。以前の結果で、DSP 濃度が 10mM 以上になると少し細胞活性が低下するという報告がある。⁽¹⁹⁾

以上より、Dode-DSP がエラスチン分子と架橋する際に出てくる DSP は 10mM 以上になると細胞に影響を与えるため、Dode-DSP の濃度も 5mM 以上になると細胞毒性を示すと考えられる。しかし、DSP 濃度 20mM の場合でも、細胞活性は大きく低下しない。それゆえ、架橋倍率 3 倍(Dode-DSP 86.3mM)での細胞包埋は細胞毒性を与えるが、架橋倍率 0.5 倍(Dode-DSP 14mM)のゲルであれば細胞包埋が可能だと考えられる。

4-3-2 エラスチンゲルによる細胞増殖への影響

エラスチンゲル上培養について、架橋倍率 3 倍のゲルとそのゲルにトレハロースを添加したもの、架橋倍率 0.5 倍のゲルを作製し、上から細胞を播種した。架橋倍率 3 倍ではゲル上に接着した細胞数が少なかった(図 3-15)。

細胞は細胞表面に存在するレセプターを介してエラスチンを認識する。このようなエラスチンレセプターは ElastinBindingProtein(EBP)、Neuraminidase-1(Neu1)、ProtectiveProteinCathepsin(PPCA)の 3 種のタンパク質のヘテロ 3 量体として存在している。EBP はエラスチン分子内の VGVAPG 配列を認識し、EBP にエラスチンが結合することで細胞内にシグナルが伝達され、細胞機能が制御される。⁽²⁰⁾また、エラスチンによるアクチン重合は完全に解明されていないが、以下のように考えられている。エラスチンは細胞表面に存在する EBP に結合し、3 量体型 G タンパクの α 部位を活性化する。そこから Guanine nucleotide exchange factor (GEF)、低分子量 G タンパク RhoA にシグナルが伝達される。活性化された RhoA は Rho キナーゼ、mDia を活性化し、アクチン重合の活性化が起こるといわれている(図 4-6)。

エラスチン A はデスモシン架橋構造が多く含まれることから、細胞接着領域である VGVAPG 配列が表面に存在しにくいいため、細胞接着性が低く、細胞増殖も抑えられると報告されている。それゆえ、架橋倍率 3 倍のエラスチン A のゲルでは架橋密度が高くなり、VGVAPG 配列がゲル表面にほとんど存在しなかったため、接着する細胞が少なかったと考えられる。また、架橋剤濃度が高いため、架橋に使われなかった Dode-DSP や、架橋時に産生される DSP が培地中に溶け出し、細胞に毒性を与えたと考えられる。そして、ゲル上での細胞が α -SMA を発現していることから、エラスチン A と結合することでアクチンを重合し、収縮型となったため、ゲル上での増殖も抑制されたと考えられる(図 3-15)。トレハロース添加のゲルでは、トレハロース無しの場合よりは細胞数は増加したように見えるが、播種した細胞数よりも明らかに少なかったため、トレハロースはエラスチンゲルへの細胞接着やゲル上での細胞増殖に影響を与えないと考えられる(図 3-16)。架橋倍率 0.5 倍のゲルでは、ゲル上に多数の細胞が存在した。架橋倍率 0.5 倍のゲルは架橋密度が低く、また、3 次元のゲルの方が二次元よりも VGVAPG 配列に細胞が接着し易く、さらに、架橋剤濃度が低いため、細胞に毒性を与えなかったと考えられる(図 3-17)。

ゲル上の細胞が局所的に固まってしまったのは、接着し易い領域であっただけでなく、ゲル表面の凹凸にも影響され、局所的に存在したと考えられるため、ゲル上に細胞を播種する場合、ゲルを作製時にゲル表面を均一にする必要がある。また、足場となるゲルの強度が細胞の移動や平滑筋細胞の分化に影響を与えるという報告もされている。足場が硬い方が細胞の運動性が高く、増殖能が増加し、分化マーカーであるカルポニン、 α -アクチンの発現が減少した。つまり、硬い足場では平滑筋細胞は脱分化し、合成型になると考えられる。^(21,22)以上より、エラスチン A で、強度の低い架橋倍

率 0.5 倍のゲル上では平滑筋細胞はより収縮型になり易いと示唆された。

細胞の存在位置について(図 3-18)、トレハロース添加ゲルでは径が大きく、貫通した孔がゲル内に存在したため、表面よりも内部に細胞が存在したと考えられる(図 4-7)。

ここで、BrdU 細胞増殖試験の結果について考察する(図 3-19,20)。まず、control が 1 日目より 3 日目の値が低くなったのは、3 日目でコンフルエントに近い状態となり、増殖できなくなったからである。また、エラスチンゲルを上から添加した場合は、エラスチン A が細胞表面の EBP と結合し、平滑筋細胞が収縮型に分化し、増殖が抑制されたと考えられる。ゲルの架橋倍率が高いほど増殖が抑えられているのは、架橋倍率が高いと架橋密度も高くなり、FBS などの細胞増殖因子の透過がし辛くなったため、平滑筋細胞が合成型に脱分化せず、さらに酸素の透過も妨げられたため増殖しにくかったと考えられる(図 3-19)。

エラスチンゲルに包埋したものの方がより増殖を抑制し、さらに、エラスチンゲル包埋によってエラスチン A と細胞表面の EBP が接する確率が高くなり、増殖が抑制されたと考えられる(図 3-20)。また、ゲル内での 3D 培養では、立体障害が生じ、細胞が増殖する十分なスペースが確保できず、さらに、細胞間の接触をゲルが阻害するために増殖が減少したとも考えられる。(23)

特に架橋倍率 3 倍は吸光度の値が高く、標準偏差も大きいことから、架橋剤濃度が高過ぎて、BrdU 細胞増殖試験に何らかの影響を与えてしまったと考えられる。

以上より、細胞包埋には架橋倍率 0.5 倍のエラスチンゲルが適しているといえる。

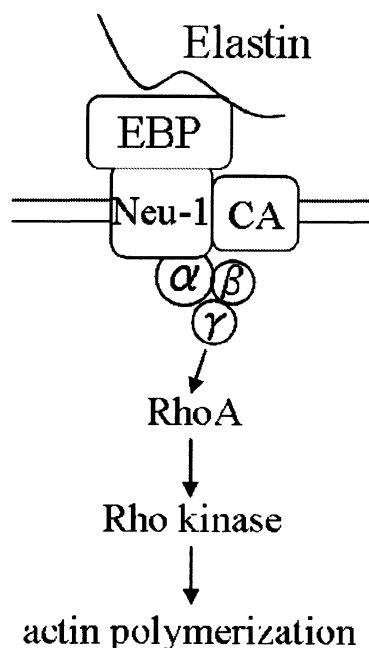


図 4-6 エラスチンによるアクチン重合

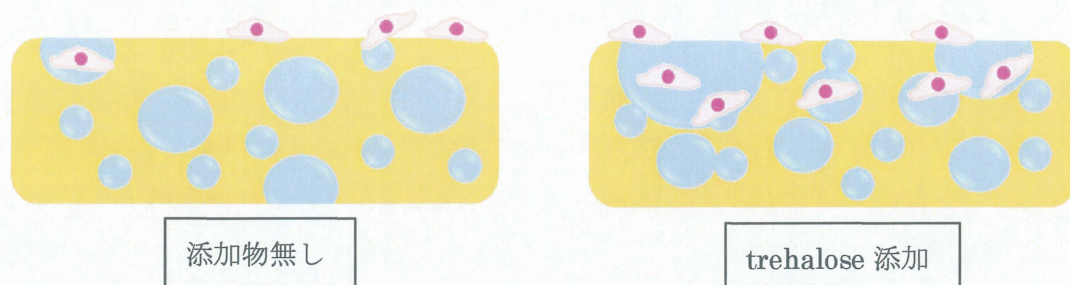


図 4-7 細胞存在位置の違い

4-4 伸展培養による細胞への影響

細胞を包埋して架橋倍率 3 倍で作製したエラスチンゲルの免疫蛍光染色による観察について、ゲル内の細胞は数が少なく、細胞核が赤く染まっただけであった(図 3-21)。これは、架橋密度が高いため、ゲル内に FBS や酸素が透過しにくく、さらに架橋剤濃度が高過ぎたため、細胞に毒性を与え、 α -SMA を発現しなかったと考えられる。架橋密度が高かったため、共焦点レーザー顕微鏡での観察の際にレーザーの透過率が悪かったが、架橋倍率 3 倍では細胞生存の可能性は低いと考えられる。

架橋倍率 0.5 倍のゲルでは、細胞が多数存在しており、 α -SMA も観察された(図 3-22, i)。部分的に細胞数が少なくなってしまったのは、 α -SMA が観察されるため、収縮型であるということと、静置培養ではゲルの立体障害のため細胞が移動できなかったからだと考えられる(図 3-22, ii)。

24 時間静置後、24 時間伸展培養したゲルは均一に多数の細胞が存在した(図 3-23)。伸展することでゲル内にスペースが生じ、細胞が均一に存在するようになったと考えられる。また、動的培養によって、アポトーシス細胞の減少や細胞増殖の促進が報告されている。これらは、動的培養によって酸素や栄養分の分配が増加するために生じたと考察されている。⁽²⁴⁾それゆえ、今回の伸展培養においても、酸素と栄養分の供給が静置よりも多く行われており、細胞数も多くなったと考えられる。

細胞形態について、静置では少し細胞が伸展したように見えるが(図 3-24)、接着シャーレで培養した細胞と比較すると、その形態は丸くなっていると言える。これは、ゲルによる立体障害だと考えられる。伸展では静置よりも丸い形態が目立っている(図 3-25)。しかし、この画像はゲルを X-Y 平面で撮影したもので、Z 軸方向の形態は見るできない。そこで、顕微鏡のピントを縦方向にずらすことで、Z 軸方向の α -SMA の発現量を確認した。Z 軸方向を縦幅、X-Y 平面を横幅とし、縦幅を横幅で割った値で静置と伸展を比較すると、伸展の方がより Z 軸に伸びていることが分かった(図 3-27)。伸

展による平滑筋細胞の配向は、ストレスを緩和するために伸展方向に垂直になるという報告がされている。⁽²⁵⁾エラスチンゲルは多孔性で、さらに伸展により、ゲル内に細胞が動くスペースが存在する。それゆえ、細胞は丸い形態ではなく、ゲル内でストレスを効果的に緩和するためにZ軸方向に伸展したと考えられる(図4-9)。

これらより、架橋倍率0.5倍のエラスチンゲルでは細胞を包埋して培養することが可能であると言える。また、伸展によってZ軸方向の細胞配向性が観察された。

以上のことから、伸縮する血管の組織欠損部位に細胞包埋エラスチンゲルを適用することで、欠損部位を充填するだけでなく、伸展刺激によって細胞が配向すると考えられる。それゆえ、細胞包埋エラスチンゲルは正常な組織を模倣する新規な足場材料になると考えられる。

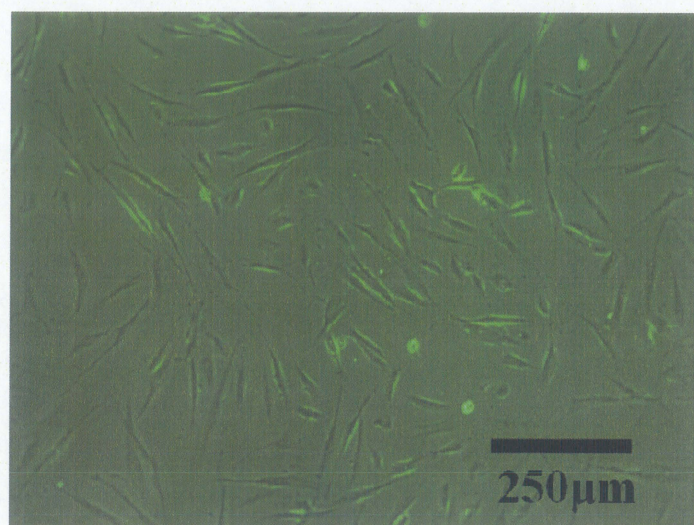


図4-8 接着シャーレ上の細胞

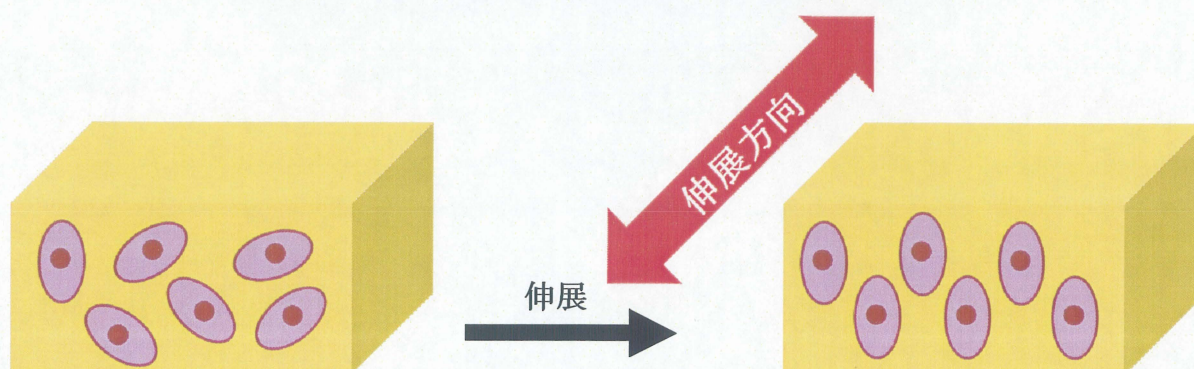


図4-9 細胞配向予想図

5. 結論

今回の実験によって、

1. ゲル化時間と pH 、架橋倍率の関係がわかり、ゲル化時間を制御できるようになった。
2. 保水性の高い添加物によってゲル微細構造を変化した。
3. 細胞への影響を観察し、細胞包埋培養に適したエラスチンゲルの条件が決定した。
4. 共焦点レーザー顕微鏡での観察、BrdU 細胞増殖試験の結果より、エラスチンゲル上または包埋した状態での細胞の生存が確認できた。
5. 24 時間の細胞包埋ゲル伸展培養では、Z 軸方向の細胞配向性が示唆された。

以上のことから、エラスチンゲルの細胞包埋培養用足場材料としての可能性が示唆された。

さらに、細胞包埋エラスチンゲルは伸縮する血管のような組織に適用すると、伸展刺激によって細胞が配向し、正常な組織を模倣する新規な足場材料になると考えられる。

6. 参考文献

- 1) 室田誠逸;再生医学・再生医療.東京化学同人(2002)
- 2) 古山義紘;エラスチン基質と伸展刺激による血管平滑筋細胞の分化誘導法.平成 19 年度 修士論文
- 3) 田畑泰彦;再生医療のためのバイオマテリアル.コロナ社(2006)
- 4) 堀内孝 et al; 医用材料工学 コロナ社(2006)
- 5) Jian Song, et al; EFFECTS OF COLLAGEN GEL CONFIGURATION ON BEHAVIOR OF VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS IN VITRO: ASSOCIATION WITH VASCULAR MORPHOGENESIS *In Vitro Cell. Dev.Biol.-Animal* 36:600-610, October 2000
- 6) Eileen Gentleman,et al; Operating Curves to Characterize the Contraction of Fibroblast-seeded Collagen gel/collagen fiber Composite Biomaterials:Effect of Fiber Mass *Plastic and Reconstructive Surgery*:508-16 2007
- 7)新海宏、et al;「知」の世界へどうぞ 第2章/千葉大学
- 8) 児玉竜彦;血管生物学/講談社(1997)
- 9) 稲熊章誠;エラスチンマトリックスによる平滑筋細胞の分化誘導 平成 20 年度修士論文
- 10) 柴田 昌和;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 年度修士論文
- 11) Suzanne M. Mithieux, et al; In situ polymerization of tropoelastin in the absence of chemical cross-linking *Biomaterials* 30 (2009) 431-435
- 12) Ariel W., et al; Modeling the controllable pH-responsive swelling and pore size of networked alginate based biomaterials *Biomaterials* 30 (2009) 6119-6129
- 13) Goutam Thakur, et al; Crosslinking of gelatin-based drug carriers by genipin induces changes in drug kinetic profiles in vitro *J Mater Sci: Mater Med* (2011) 22:115-123
- 14) Jinshu Mao, et al; Study of the Near-Neutral pH-Sensitivity of Chitosan/Gelatin Hydrogels by Turbidimetry and Microcantilever Deflection *Biotechnology and Bioengineering, Vol. 95, No. 3, October 20, 2006*
- 15) 大原健太郎;弾性板再生型人工血管作製を目的としたエラスチンゲルの力学特性 平成 21 年度修士論文
- 16) Bryan P. Toole;Hyaluronan in morphogenesis *CELL & DEVELOPMENTAL BIOLOGY, Vol. 12, 2001: pp. 79-87*
- 17) Wiebke Hayen, et al; Hyaluronan stimulates tumor cell migration by modulating the fibrin fiber architecture *Journal of Cell Science* 112, 2241-2251 (1999)

- 18) 吉田智子;トレハロースのラマン錯乱 お茶の水大学大学院(2001)
- 19) 新 真樹;血管系細胞の細胞外基質認識性に関する研究 平成 17 年度修士論文
- 20) Aleksander Hinek, et al; Lysosomal Sialidase (Neuraminidase-1) Is Targeted to the Cell Surface in a Multiprotein Complex That Facilitates Elastic Fiber Assembly *BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 281, NO. 6, pp. 3698–3710, February 10, 2006*
- 21) Shelly R. Peyton, et al; The use of poly(ethylene glycol) hydrogels to investigate the impact of ECM chemistry and mechanics on smooth muscle cells *Biomaterials 27 (2006) 4881–4893*
- 22) Satoru Kidoaki, et al; Microelastic gradient gelatinous gels to induce cellular mechanotaxis *Journal of Biotechnology 133 (2008) 225–230*
- 23) Jan P. Stegemann, et al; Altered response of vascular smooth muscle cells to exogenous biochemical stimulation in two- and three-dimensional culture *Experimental Cell Research 283 (2003) 146–155*
- 24) Chiara Arrigoni, et al; Rotating Versus Perfusion Bioreactor for the Culture of Engineered Vascular Constructs Based on Hyaluronic Acid *Biotechnology and Bioengineering, Vol. 100, No. 5, August 1, 2008*
- 25) KEIJI NARUSE, et al; Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch *Am J Physiol Heart Circ Physiol 274:H1532-H1538, 1998.*

7. 謝辞

本研究及び修士論文作成にあたり、ご指導、ご鞭撻のほどいただきました 三重大学工学部 堀内 孝 教授、宮本 啓一 准教授に対し深く御礼申し上げます。特に宮本先生には実験や生活面に関して多くの助言や指摘を頂きました。様々な面で至らなかった私にとって、自分で考え、成長するための良い機会となりました。さらに、ご多忙でありながらも実験に必要な試薬、装置を作って頂き、本当に感謝しております。未熟な私ですが、来年度からは三重大大学の卒業生として恥ずかしくないような社会人になりたいと思います。誠にありがとうございました。

また、修士論文を発表するにあたり、副査を担当して頂いた分子生物研究室の湊元 幹太 先生には深く感謝しております。

本研究を進めるにあたり、「エラスチン」をテーマとする水谷 直紀さん、石田 尚志君、石原 千明さん、前田 裕子さん、佐々木 剛君、神谷 歩君、境 淳志君、中村 雅広君には、水溶性エラスチンの抽出や実験などを助けて頂きました。本当にありがとうございました。

修士 2 年目から細胞を取り扱うことになった際、水谷 直紀さんには貴重な時間を割いて丁寧な指導をして頂きました。おかげで細胞の取り扱いが一人でできるようになり、本研究における重要な結果を出すことができました。また、エラスチンを用いた 3D 培養において同じ様な問題に悩まされながらも、的確な意見をして頂いた前田 裕子さんに心より感謝致します。そして、コラーゲン、エラスチンの抽出や実験の手伝いをして頂いた熊澤 雄基君、本当にありがとうございました。テーマは「コラーゲン」ですが「エラスチン」グループに必要不可欠な存在でした。

研究面だけでなく、生活面でも支えて頂いた、伊藤 寛之君、篠原 紀子さん、永田 裕子さん、山崎 慎也君、本当にありがとうございました。充実した研究室生活を送ることができました。

最後に研究室生活においてのサポートだけでなく、気さくにお話して頂いた村上 節子さん、毎日を共に過ごした M1、4 年生の皆様方に深く御礼申し上げます。

平成 23 年 3 月
羽多野 由季子

8. 付録

8-1 エラスチンの調整

8-1-1 不溶性エラスチンの抽出

[試薬・器具・装置]

- ・ 豚大動脈(三重県松坂食肉流通センター)
- ・ 塩化ナトリウム(WAKO)
- ・ 99.5%エタノール (WAKO)
- ・ アルミ圧力鍋
- ・ ミキサー
- ・ メッシュ
- ・ 500 ml ビーカー

[操作]

- ① 血管を水道水で洗浄した。
- ② 血管の表面に付着している組織や血塊をはさみで切り取り、水道水で洗浄した。
- ③ 塩水(10%)に漬けて、冷蔵庫の中で一日保存した。
- ④ 透明になったコラーゲンをはさみで切り取った。
- ⑤ 塩水(10%)に漬けて、冷蔵庫の中で一日保存した。
- ⑥ 新しい塩水(10%)と交換し、さらに冷蔵庫の中で一日保存した。
- ⑦ 水道水で洗浄後、圧力鍋に入れ一時間煮た。
- ⑧ 圧力鍋から取り出して水道水でよく洗浄した後、ミキサーにかけた。
- ⑨ 圧力鍋に移して、灰汁を取り除いた後、さらに一時間煮た。
- ⑩ メッシュに移して、水道水でよく洗浄した後、一日流し洗いをを行った。
- ⑪ よく水をきってから洗濯機に移し入れ、蒸留水で 10 分間洗浄した。(×4 回)
- ⑫ 洗浄後、よく水をきってからビーカーに移し、50%エタノールを加え 30 分間放置した。
- ⑬ 50%エタノールを取り除いて、70%エタノールを加え 90 分間放置した。
- ⑭ 70%エタノールを取り除いて、90%エタノールを加え一日放置した。
- ⑮ デシケーターに入れ乾燥した。(1～2 週間)

8-1-2 水溶性エラスチンの調整

[試薬・器具・装置]

- ・ 不溶性エラスチン
- ・ シュウ酸(wako)
- ・ 50ml 遠沈管(IWAKI)
- ・ 50ml 遠沈管(nunc)
- ・ 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)

[操作]

I. 前処理

- ① 不溶性エラスチンを 10 g ずつ取ってガラス製遠沈管に入れた。
- ② 0.25 M のシュウ酸を 45 ml ずつ加え、冷蔵庫に一晩保存した。

II. シュウ酸処理

- ① 前処理したものを 100 °C の油槽で、一時間加熱した。
- ② 氷水で十分に冷やしてから、遠心分離(3000 rpm、6 min)した。
- ③ 上澄み液を除去分子量 10000~14000 のセロハン透析チューブに入れた。
- 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 で一時間加熱した。
- ⑤ エラスチンが全て溶けるまで①~④の操作を繰り返した。上澄み液を入れた透析チューブを、水道水で 2~3 日流し洗いしてから、脱イオン水で透析し、外液の pH が 5~6 程度になるまで透析を行った

III. 水溶性エラスチンの取り出し

- ① チューブから上澄み液を取り出して、遠心分離(3000 rpm、6 min)した。
- ② 上澄み液をガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液を 2~3 日凍結乾燥することで水溶性エラスチンを得た。
- ③

8-1-3 水溶性エラスチンの分画

熱シュウ酸処理の加熱時間 1h 毎で区分けした水溶性エラスチンを用いて、凝集温度測定・弾性率測定を行い、それぞれのサンプルのクラス分けを行う。

【凝集温度測定】

[試薬・器具・装置]

- ・ 水溶性エラスチン
- ・ 脱イオン水
- ・ 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
- ・ ネジロ試験管(マルエム)

[操作]

- ① サンプル瓶で、水溶性エラスチンが濃度 1%(v/v)になるように脱イオン水を加え調整する。
- ② 溶液 3ml をディスポセルに移し変え透過光測定装置にセットする。
- ③ 恒温槽で溶液の温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定する。
- ④ 水溶性エラスチンの凝集温度は、透過光強度が初期値の半分になった時の温度と定義し、以下の表に従って水溶性エラスチンの分画を行う。

表 8-1 エラスチン溶液の凝集温度による分画

クラス	A	B	C	D	E
凝集温度(℃)	～22.5	22.5～25	25～30	30～35	35～50

【弾性率測定】

[試薬・器具・機器]

- ・ 水溶性エラスチン
- ・ Dode-DSP
- ・ 脱イオン水
- ・ 試験管 (マルエム)
- ・ キャピラリーチューブ (内径 1mm 外径 1.55mm) (テフロン)
- ・ シリコンチューブ (内径 1mm) (AS ONE)
- ・ 1.0ml シリンジ (TERUMO)
- ・ 遠心分離器 CT 6D (HITACHI)
- ・ ネジロ試験管 (マルエム)
- ・ ウォーターバス OSB-20 (EYELA)
- ・ オートクレーブ IST-150 (Pasolina)
- ・ 弾性率測定装置
- ・ アナログ計測計算機 (アズワン)

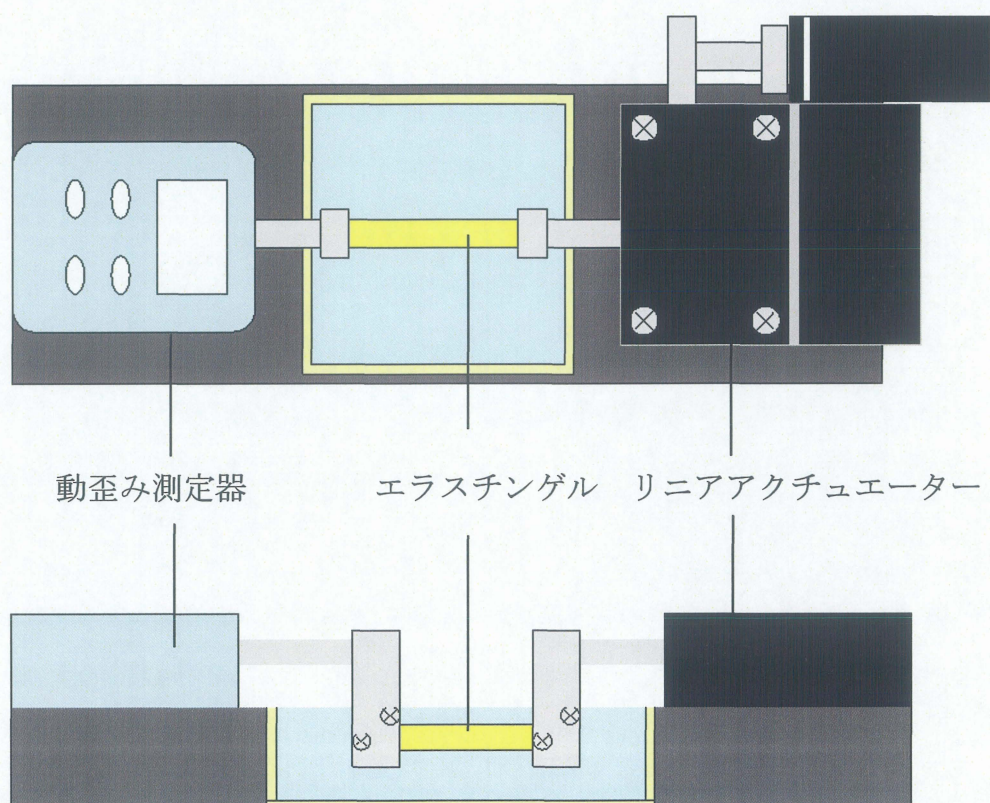


図 8-1 弾性率測定装置

[弾性率(ヤング率)の求め方]

断面積 $A(\text{m}^2)$ の物体を一軸方向に力 $F(\text{N})$ で引き伸ばし、物体の長さが $I_0(\text{m})$ から $I(\text{m})$ へと変形した時、その時の応力 $\sigma(\text{Pa})$ と歪 γ は次の式で求められる。

$$\sigma = F / A$$

$$\gamma = (I_0 - I) / I_0$$

フックの法則より、応力の大きさが限界内にあるときは、応力と歪は比例関係にあるので、弾性率 $E(\text{Pa})$ は次の式で求められる。

$$E = \sigma / \gamma$$

[操作]

- ① エラスチン濃度 40%、アミノ基に対する架橋剤倍率が 2 倍になるように、水溶性エラスチン、Dode-DSP、脱イオン水を混合し、遠心分離器 (2000rpm・3min) にかけて脱気する。
- ② 脱気したエラスチン溶液を 3cm の長さに切ったキャピラリーに詰め、栓をして密封した後、ネジロ試験管に入れて、再び遠心分離器 (1500rpm・3min) にかけて脱気する。
- ③ 遠心後、キャピラリーの入ったネジロ試験管を脱イオン水で満たし、70℃にしたウォーターバスに入れて 30 分加熱する。
- ④ その後、キャピラリーを脱イオン水で満たされたネジロ試験管に入れたまま遠心分離 (1500rpm・3min) にかけて、その後、試験管をアルミホイルで包み、直立させた状態でオートクレーブに設置し、121℃で 30 分加熱する。
- ⑤ 加熱後、キャピラリーを室温になるまで冷却し、エラスチンゲルをキャピラリーから取り出し、脱イオン水 (37℃) で一晩洗浄する。
- ⑥ 洗浄し、1.5cm 程度に切ったエラスチンゲルの両端にスペーサーを付け、弾性率測定器で挟み、固定する。
- ⑦ ゲルが常に脱イオン水 (37℃) に浸るようにし、また、測定前のゲルに力がかからないよう調整する。
- ⑧ ゲルを一秒間に 0.5mm ずつリニアアクチュエーターで引っ張り、その際、動歪み計測器に表示される張力をアナログ計測計算機に読み取らせる。
- ⑨ ゲルが破断するまで測定を続け、計測値から応力と歪を計算し、弾性率を求め、以下の表に従い水溶性エラスチンを分画する。

表 8-2 エラスチンゲルの凝弾性率による分画

クラス	A	B	C	D	E
弾性率 (kPa)	50～	25～50	5～25	～5	ゲル化しない

凝集温度と弾性率の測定によるクラスが合致したサンプルはそのクラスのサンプルとして扱う。また、2 つの測定の結果が隣り合うクラスだった場合は、高いほうのクラスとして扱う(例:凝集温度がクラス B、弾性率がクラス A ならクラス A として扱う)。結果が 2 クラス以上はなれた場合(例:凝集温度がクラス B、弾性率がクラス D)、そのサンプルは不適格として除外する。

表 8-3 水溶性エラスチンの分画

クラス	A	B	C	D	E
凝集温度 (°C)	～22.5	22.5～25	25～30	30～35	35～50
弾性率 (kPa)	50～	25～50	5～25	～5	ゲル化しない

クラス分けされたサンプルをクラス毎に混合し、再度測定した結果が上記の表に合致した場合のみ、そのクラスの水溶性エラスチンとして使用する。

8-2 走査型電子顕微鏡(SEM)撮影

8-2-1 試料の作成

[試薬]

- ・ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Wako, Lot No. LDH2678, Cat No. 192-02815)
- ・ Na_2HPO_4 (Wako, Lot No. KCG5195, Cat No. 197-02865)
- ・ glutaraldehyde (東京化成工業, Lot No. FGL01, Cat No. G0068)
- ・ ホルムアルデヒド液(Wako, Lot No. LEM4049, Cat No. 064-00406)
- ・ 酸化オスミウム(VIII)(2%水溶液)(ナカライテスク, Lot No. V8N8335, Cat No. 25746-06)
- ・ ギ酸(Wako, Lot No. EWE1179, Cat No. 066-00466)
- ・ ethanol(Wako, Lot No. AGH2000, Cat No. 052-00467)
- ・ t-butylalcohol(ナカライテスク, Lot No. M8F2732, Cat No. 06104-25)

I 試料の前処理

乾燥試料(ファイバーなど)の場合は I、II は飛ばしてよい。

[操作]

靱帯組織中の弾性線維の場合

- ① 試料を 4 %ホルムアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 pH7.4 で 24 時間固定した。
- ② 試料を適当な大きさに切断した。
- ③ 脱イオン水で洗浄後、試料を 45 °C、90 %ギ酸溶液で 4 日間処理した。
- ④ 脱イオン水中で 12 時間洗浄した。
- ⑤ 50 %、70 %、90 %、99 %エタノール/脱イオン水で 10 分ずつ段階的に脱水した。
- ⑥ 50 % t-ブチルアルコール/エタノールで 15 分置換した。
- ⑦ 37 °C、100 % t-ブチルアルコールで 30 分置換した。
- ⑧ t-ブチルアルコールで置換した試料をサンプル瓶にいれ、試料が完全に浸る程度に t-ブチルアルコールを入れて凍結乾燥した。

自由表面の細胞の場合

- ① シャーレ上の細胞を PBS で 2 回洗浄した。
 - ② 2.5 %グルタルアルデヒド/0.1 Mリン酸緩衝液 pH7.4、4 °C で 2 時間前固定した。
 - ③ 4 °Cリン酸緩衝液で 15 分×4 回洗浄した。
 - ④ 1 %四酸化オスミウム/0.1 Mリン酸緩衝液 pH7.4 で 1 時間後固定した。
 - ⑤ 4 °Cリン酸緩衝液で 10 分洗浄した。
 - ⑥ 50 %、70 %、90 %、99 %エタノール/脱イオン水で 10 分ずつ段階的に脱水した。
 - ⑦ 50 % t-ブチルアルコール/エタノールで 15 分置換した。
 - ⑧ 37 °C、100 %t-ブチルアルコールで 30 分置換した。
 - ⑨ t-ブチルアルコールで置換した試料をサンプル瓶にいれ、試料が完全に浸る程度に t-ブチルアルコールを入れて凍結乾燥した。
- ※ 四酸化オスミウムは危険なので作業はドラフト内で行い、廃液は正規の処理をすること。

II 試料の乾燥

[機器]

VFD-21S(Vacuum devise inc.) (図 8-2)

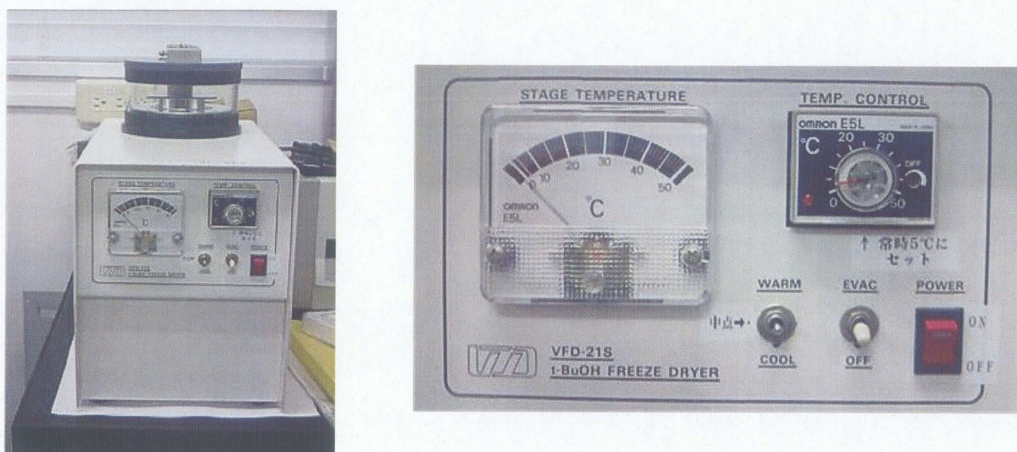


図 8-2 t-ブチルアルコール用凍結乾燥機 (VFD-21S)

- ① 後部のトラップコップを水で満たした。
- ② POWER をオンにし、左のスイッチを COOL に合わせ、内部の温度が 4 °C になるまで待った。
- ③ 4 °C になったら予め t-ブチルアルコールに浸して凍らせておいたサンプルを、サンプル瓶ごと台座にセットし、押さえ蓋を置き、30 分待った。

- ④ EVAC をオンにし、乾燥を開始し、周囲の氷がなくなるまで待った。内部までしっかり乾燥させる為、完全に氷が無くなってからさらに 30 分放置した。
- ⑤ 30 分経過したら、温度スイッチを WARM に合わせ、温度が 30℃ になるまで待った。
- ⑥ スwitchを中点に戻した後、EVAC をオフにして吸引を停止した。
- ⑦ 乾燥が終了したサンプルはデシケーター内で保存し、吸湿しないようにした。

Ⅲ イオンスパッターによる試料の金コーティング

[機器]

- ・日立イオンスパッターE1010 (図 8-3)

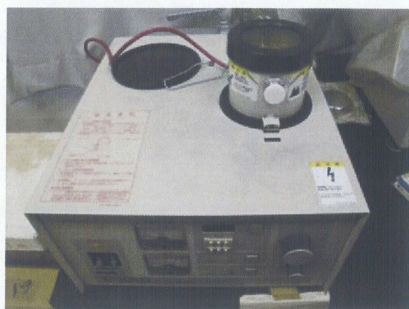


図 8-3 イオンスパッター装置

- ① SEM 用の試料台に両面テープでサンプルを固定した。この時、撮影したい面が上を向くようにし、なるべく平らになるように張り付けた。
- ② 試料台の裏側(ねじ穴のある側)にシャーペンなどで番号を記入し、サンプルの区別が付くようにした。
- ③ 金スパッタリング用の台座にサンプルを試料台ごとセットした。台座に空きができる場合にはテープで塞いだ。
- ④ イオンスパッターの MAIN VALVE を開き、台座をセットし、POWER をオンにして、圧力が 10 Pa まで下がるのを待った。
- ⑤ 10 Pa になり、Ready のランプが点灯してから 1～2 分待ち、スパッタリング時間を 120 sec に set を押した。
- ⑥ DISCHARGE をオンにして金イオンを飛ばし、終了したら POWER をオフにし、試料台を取りだした。

8-2-2 SEM 撮影法

[装置]

・パソコン

・日立走査型電子顕微鏡 S4000 (図 8-4)

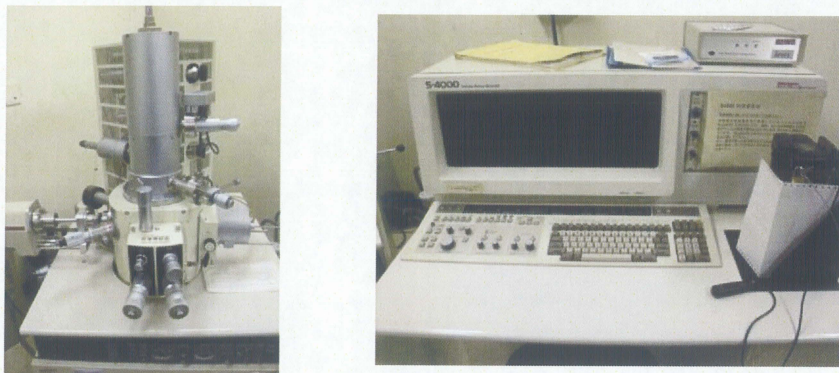


図 8-4 走査型電子顕微鏡

- (1) 撮影前に装置内部の試料台が $x=12.5$ 、 $y=12.5$ 、傾き=0 の位置にある事を確認した。
- (2) displaypower とカメラの電源を入れた。同時に、パソコンの電源を入れ、EOS utility を起動させた。
- (3) サンプルを高さ調整台に乗せ、固定台と固定した。
- (4) EVAC を押し内部を真空状態にした(基本的に真空状態になっている)。
- (5) 左上部のレバーが CLOSE になっていることを確認してから、AIR を押した。
- (6) 前室部分を開き、固定台を棒にセットした。
- (7) 棒を固定して、前室部分を閉じ、EVAC を押して真空にした。
- (8) 緑のランプが点灯し、high の位置にある事を確認してから 20 秒ほど待ち、その後レバーを OPEN にして、試料を内部試料台に乗せた。
- (9) 棒を抜き、前室部分に固定したらレバーを CLOSE にし、右下にある SPECIMENE STAGE と AIR LOCK VALVE のつまみをそれぞれ LOCK と OPEN にした。
- (10) キーボード左上端にある HV の ON を押した(図 8-5)。

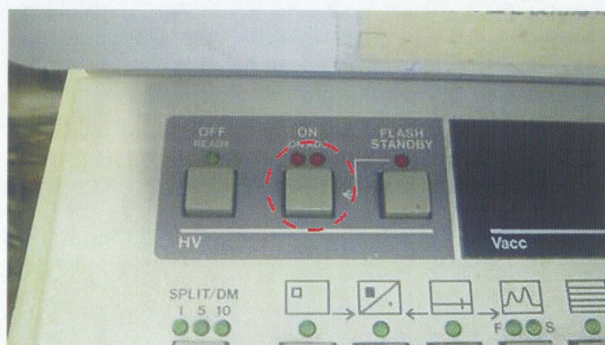


図 8-5 キーボード上 HV ON

(11)Vacc、Vext、EMISSION の値がそれぞれ安定したら ABC を押し、画面のコントラストを合わせた(図 8-6)。



図 8-6 上図:Vacc、Vext、EMISSION、下図:コントラスト及び撮影倍率調整

(12)本体のつまみを回し、画像を動かし、サンプルを探した。

(13)MAGNIFICATION のつまみ(図 8-6)を回し、撮影倍率を決定した。

(14)STIGMA: AUTO→FOCUS: AUTO の順で押していき、画像のピントを調整した(図 8-7)。

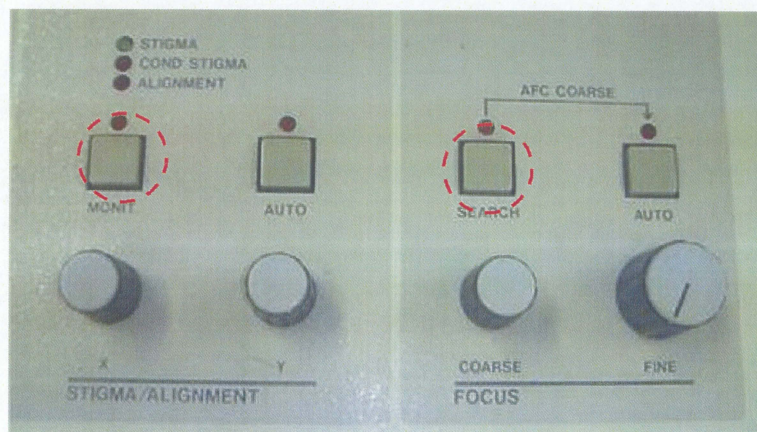


図 8-7 ピントの調整

(15)SCAN SPEED を1にし(次図矢印を1回押す)、RUN/STOP:Aを押して画像を静止画にした(図 8-8)。

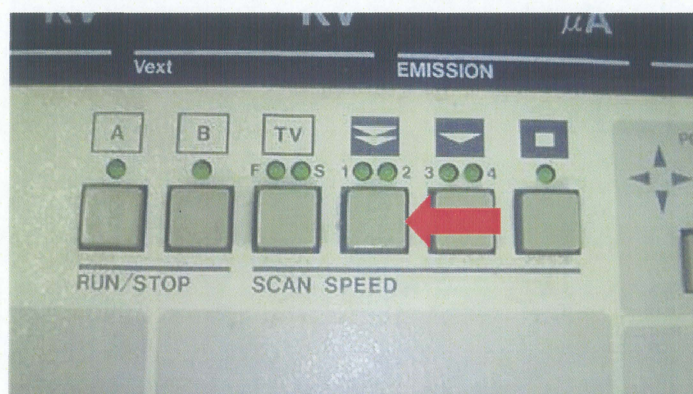


図 8-8 SCAN SPEED の調節

(16)カメラのシャッターを開き、キーボード右上端の PHOTO:DIRECT を押した(図 8-9)。

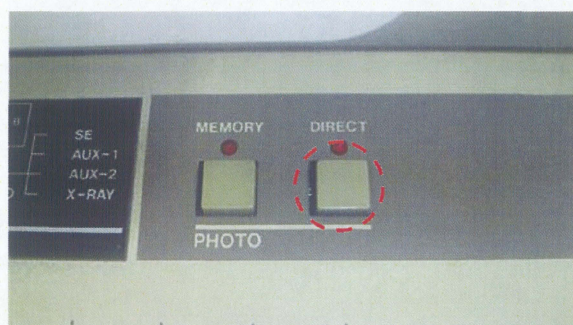


図 8-9 SEM 画像取得開始ボタン

(17)「ピー」と音が鳴ったら、シャッターを閉じた。(この時、パソコン画面の SEM 画像フォルダに撮影した画像が表示される)

(18)SCAN SPEED:TV を一回押し、RUN/STOP:A を押した後に(11)～(17)の工程を繰り返して撮影した。

(19)サンプルの撮影を終了する時は HV の OFF を押した後、SPECIMENE STAGE と AIR LOCK VALVE のつまみをそれぞれ FREE と CLOSE にした(図 8-10)。

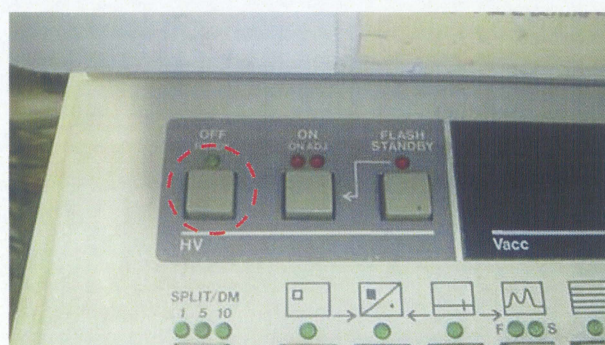


図 8-10 SEM 撮影の終了

- (20)レバーを OPEN にし、固定台を内部試料台から取り出した後、レバーを CLOSE に戻し、AIR を押してサンプルを取り出した。
- (21)サンプルを交換して再度撮影するときは(5)から同様の作業を行った。
- (22)全工程終了時に SEM 画像フォルダ中の画像を全てメディアに保存した。

8-3 培地、試薬の調整

[試薬・器具・装置]

- ・ CS-C Medium(WITHOUT GF)(4Z0-500S/cell systems)
- ・ Fetal bovine serum (FBS) (EQUITCH-BIO)
- ・ Trypsin-EDTA solution (10x) (T-4174/SIGMA)
- ・ 各種アシストチューブ (アシスト)
- ・ 各種シリンジ (テルモ)
- ・ 孔径 0.22 μm フィルター (Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)
- ・ Stericup フィルターユニット (SCGVU05RE/MILLIPORE)
- ・ 恒温槽 (BT-15/Yamato)

[培地の調製]

- ① 凍結保存してある hFGF-B、インシュリン、GA-1000 の各バイアルを恒温槽で解凍した。
- ② バイアルの周囲をアルコールで拭いた。
- ③ ピペットを用いて、各バイアル中の全量を培地に入れ、培地で共洗いした。
- ④ 培地を 4℃ (冷蔵庫) で保存した。

[各溶液の調製]

・FBS (牛胎児血清) の不活性化、分注、保存

[操作]

- ① 37℃の温水で解凍した後、数回振り、55～56℃の温水で、時折振り混ぜながら 30 分間加温した (不活性化)。
- ② Stericup フィルターユニットでフィルター滅菌を行い、30 ml アシストチューブに 25 ml ずつ分注した。作業はクリーンベンチ内、滅菌状態で行った。
- ③ 分注後の溶液は冷凍庫 (−20℃) で保存した。

・Trypsin-EDTA solution (10x)

[操作]

37℃の温水で解凍した後、5 ml アシストチューブに 4 ml ずつ分注し、冷凍庫 (−20℃) で保存した。

滅菌水の作成

[操作]

- ① 脱イオン水を密閉できるガラスビン(赤蓋の 1L メディウムビン)に入れる。
- ② 蓋をきっちり締めた後、滅菌テープで封印し 121℃/40 分にて高圧蒸気滅菌を行う。

8-4 細胞培養

[試薬・器具・装置]

- ・ Phosphate Buffered Saline(PBS)(D-8537/SIGMA)
- ・ セルバンカー(日本全薬工業)
- ・ 75cm² 培養フラスコ(MS-21250/住友ベークライト)
- ・ φ35 シャーレ、各種プレート(住友ベークライト)
- ・ Chamber slide 8 chamber(117745/Nunc)
- ・ 各種遠沈管(住友ベークライト,Nunc)
- ・ エルマ血球計算盤 (Erma)
- ・ CO₂ インキュベーター(池本理化工業)
- ・ 遠心機(2010/KUBOTA)
- ・ ボルテックス(S-100/TAITEC)
- ・ 恒温槽(BT-15/Yamato)

[継代培養 ―ヒト大動脈平滑筋細胞―]

I 細胞の洗浄

- ① 培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌する。
- ② 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引する。
- ③ PBS 溶液 5 ml/25 cm² フラスコ又は 10 ml/75 cm² フラスコを添加し、前後左右に振り洗浄する。
- ④ 滅菌済みパスツールを加熱滅菌し培養フラスコ内に挿入し、洗浄液を吸引する。

II 培養細胞の剥離方法

- ① 冷凍保存してあるトリプシン 0.6 ml に PBS 溶液 5.4 ml を加え、10 倍希釈する。
(以下トリプシン溶液)
- ② トリプシン溶液 2 ml/25 cm² フラスコ又は 6 ml/75 cm² フラスコを加え、1 分間放置する。
- ③ 顕微鏡で細胞がはがれたことを確認後、FBS 1 ml/25 cm² フラスコ又は 2 ml/75 cm² フラスコを加える。
- ④ 細胞をピペッティングで培養フラスコから剥離させる。
- ⑤ 滅菌済み 10 ml のピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15 ml 遠心管に入れる。
- ⑥ 100G(800 rpm) 1 分間原則 4℃) 5 分間遠心分離する。
- ⑦ 培養フラスコに CS-C(+) 培地を入れ、37℃の 5%CO₂ インキュベート内にて放置しておく。
- ⑧ ⑥で遠心分離した上澄みをピペットで吸引する。
- ⑨ CS-C(+) 培地を 1 ml 又は 3 ml を遠心管に沈殿している細胞に加え、細胞懸濁液を作成し、10 回ピペッティングを行う。
- ⑩ 細胞懸濁液を取り、⑦で用意しておいた培養フラスコに播種し、37℃の CO₂ インキュベート内にて培養する。

※細胞懸濁液濃度は血球計算版にカバーガラスをのせ、その隙間に培養フラスコに播種する直前の細胞懸濁液 10 µl を注入して、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。1 mm² の面積の細胞を数えて、液の厚みを 0.1 mm としたときの細胞懸濁液濃度は 細胞測定数×10⁴ cells/ml とした。

[培地交換と培地・懸濁液量]

培地交換

[操作]

- ① あらかじめ交換する培養培地を 37℃の温水で温めたものを使用した。
- ② 滅菌済みパスツールで細胞培養培地を吸引した。
- ③ 細胞培養に使用する各容器に対してそれぞれ適量の培養培地を加えた。

培地量と細胞懸濁液(濃度 5×10⁵ cells/ml)播種量

表 8-4 各容器に対する培地量と懸濁液播種量

容器	培地量	懸濁液播種量
φ35 シャーレ	2 ml	0.2 ml
75cm ² フラスコ	15 ml	1 ml
6 穴プレート(1 穴)	2 ml	0.2 ml
96 穴プレート(1 穴)	100 μl	10 μl
8 穴チャンバー(1 穴)	300 μl	50 μl
12wells Transwell	0.5 ml(apical)-1.5 ml(basal)	50 μl(apical)

〔細胞の凍結〕

大動脈血管平滑筋細胞の凍結はセルバンカーの凍結液を用いた。

(参考:内皮細胞-セルバンカー、バンバンカー 線維芽細胞-セルバンカー)

〔操作〕

- ① 継代培養の手順に従い、II 培養細胞の剥離方法の⑧まで行った。
 - ② 上澄み液を除去し、凍結液 1 ml を加えてピペッティングすることで凍結用細胞懸濁液を作成した。
 - ③ 2 ml アシストチューブに細胞懸濁液を加え、-80℃の冷凍庫内で凍結した。
- ※冷凍庫の温度変化は細胞へ大きく影響を与えるため、発泡スチロールの入れ物などに入れ、凍結後の温度変化を防いだ。

〔細胞の解答〕

〔操作〕

- ① 75cm² フラスコに CS-C(+)を 14 ml 入れ、37℃、5%CO₂ インキュベート内でプレインキュベートした。
- ② -80℃で凍結してあった内皮細胞の 2 ml アシストチューブを、37℃の温水で解凍した。僅かに氷が残る程度に加温を抑えた。
- ③ 解凍した細胞懸濁液を、あらかじめ用意しておいた 15 ml 遠沈管中の 9 ml の CS-C(+)に加えた。
- ④ ボルテックス後、800 rpm で 5 分間遠心分離を行った。
- ⑤ 上澄み液をとり、1 ml の CS-C(+)を加えてピペッティング後、75cm² フラスコに加えた。

8-5 動画撮影法(動画撮影を用いた細胞観察)

動画撮影とは

ここでの動画撮影とは、実験サンプルを顕微鏡下で位置を固定しながら培養し、そのときの映像をパソコンへ取り込み、一定時間ごとに静止画を連続して撮り続け、撮影終了後、パラパラ漫画のように撮影した画像をソフトを用いて繋げることによって動画を作製することを言う。

動画撮影の一番のメリットとしては、撮影位置を固定できるので特定細胞の経時変化を長時間観察できることである。また、撮影間隔を短時間から長時間まで目的に合わせて自由に設定できることもメリットである。静止画撮影との比較を表 8-5 に示す。



図 8-11 動画撮影用顕微鏡



図 8-12 顕微鏡付属培養装置

表 8-5 撮影方法の比較

	動画撮影	静止画撮影
特定細胞の経時変化	◎ 撮影位置が固定できる	△ 撮影位置の固定ができない
視野	△ 一視野のみ	◎ 複数の視野が可能
撮影間隔	◎ 短時間が可能	△ ある程度の間隔が必要

[試薬・器具・装置]

- ・落射蛍光顕微鏡 (OLYMPUS)
- ・CO₂ 培養装置 (OLYMPUS)
- ・ヒーター
- ・φ35 シャーレ (住友ベークライト)

[操作]

I 顕微鏡の準備

- ① 顕微鏡の周囲をエタノールで拭く。
- ② ヒーターにミリ Q 水を注ぐ。
- ③ ヒーターの温度を TOP、STAGE HEATER を共に 37℃ に設定する。
- ④ CO₂ ガスボンベの栓を適度にあける。
- ⑤ AIR を 200 ml/min、CO₂ を 10 ml/min に調節し、5 %CO₂ 培養装置にする。

II 撮影の開始

- ① シャーレを顕微鏡付属の 37℃、5 % CO₂ インキュベーターにセットする。
 - ② 顕微鏡の電源を入れ、パソコンにて XCAP を起動する。
 - ③ XCAP で顕微鏡の映像を取り込み、ピント、撮影場所、明るさを調節する。
- ※播種した直後の細胞の接着・伸展を観察する場合、ピントは浮遊細胞に合わせて
るのではなく、シャーレ表面に合わせる。
- ④ 撮影場所が決定したら撮影を開始する。

III 撮影の終了

- ① XCAP を終了する。
- ② ヒーターを止め、ガスボンベの栓を閉める。
- ③ ヒーターの水を捨て顕微鏡の周囲をエタノールで拭く。
- ④ シャーレは 37℃、5%CO₂ インキュベーター内に戻して培養する。
- ⑤ 撮影した画像をパソコンソフト Virtual Dub を用いて動画を作成する。

動画撮影時の注意事項

細胞を扱うため顕微鏡付近を清潔に保つこと。

撮影中は顕微鏡と実験台にぶつからないよう注意すること。

顕微鏡の周りに光を遮るものは置かない様にし、撮影中は実験室の電気は消さないこと。

※動画撮影用の顕微鏡は実験室中にあるため汚染されやすい。動画撮影を行う際にはより一層の注意が必要である。

～ソフト使用方法～

画像取り込みソフト XCAP 使用方法

- ① パソコンで XCAP を起動する。メニューバーの「PIXCI」から「Open/Close」→「Multiple Devices」を選択しクリックする。
- ② 顕微鏡を 2 台同時に使用するならば「Use Common & Controls W.Cameras Synchronized」を、1 台ずつ使用するならば「Use Individual Format & Control」を選択し「OK」から「OPEN」をクリックする。
- ③ 左にある絵文字メニューの右側上から 3 番目のボタンをクリックし画像をパソコンのモニターに映し出し、顕微鏡側でピント、撮影場所、画像の明るさの調整を行う。
- ④ 撮影可能な状態になれば使用する顕微鏡の Unit 番号のメニューバーの「Capture」から「Sequence Capture」→「Video to Image File」をクリックする。
- ⑤ メニューバーの「File」から「Browse」で画像の取り込み名を決め、画像取り込み形式は Jpeg を選択する
- ⑥ メニューバーの「Capture」から「Image to Save」で撮影枚数、「Time Interval」で撮影の間隔を決定し、「Snap Video at Time」、「Linear Sequence」、「Event Free」がチェックされていることを確認する
- ⑦ 「Record」をクリックすると撮影が開始する

動画作製ソフト Virtual Dub の使用方法

※Virtual Dub はインストール後、日本語化済みとする。

- ① パソコンで Virtual Dub を起動する。
- ② メニューバーの「ファイル」から「ビデオファイルを開く」を選択し、連番画像の最初のファイルを選択して「開く」をクリックする。
- ③ メニューバーの「映像」から「フレームレート」を選択、「Change to frames persecond」をチェックし適当な値を入力する。
- ④ メニューバーの「映像」から「フィルター」を選択、「add」をクリックしリストの中から「resize」を選択、画像サイズを 640×480 にする。
- ⑤ メニューバーの「映像」から「Filters」を選択、「add」をクリックしリストの中から「grayscale」を選択し、「OK」をクリックする。
- ⑥ 「映像」から「圧縮」を選択、「Cinepak Codec by Radius」を選択し「OK」をクリックする。
- ⑦ 「ファイル」から「名前を付けて保存」を選択し、適当な名前を「OK」をクリックする⇒動画の作製が開始される。

8-6 免疫蛍光染色

〔測定原理〕

免疫化学染色は、特定のタンパク質を検出する方法で、各々の細胞の特異的なタンパク質を標識し、それを確認することにより細胞の同定を行う。

特定タンパクに一次抗体を認識させ、さらにその一次抗体を抗原として認識する蛍光物質を標識した二次抗体を用いる。二次抗体には特定の動物種の免疫グロブリンを認識する抗体を利用する。同じ動物種の由来の一次抗体であれば二次抗体が認識可能である。

それぞれの蛍光物質に対応する波長の励起光当て、蛍光を検出する。

(図 8-13)

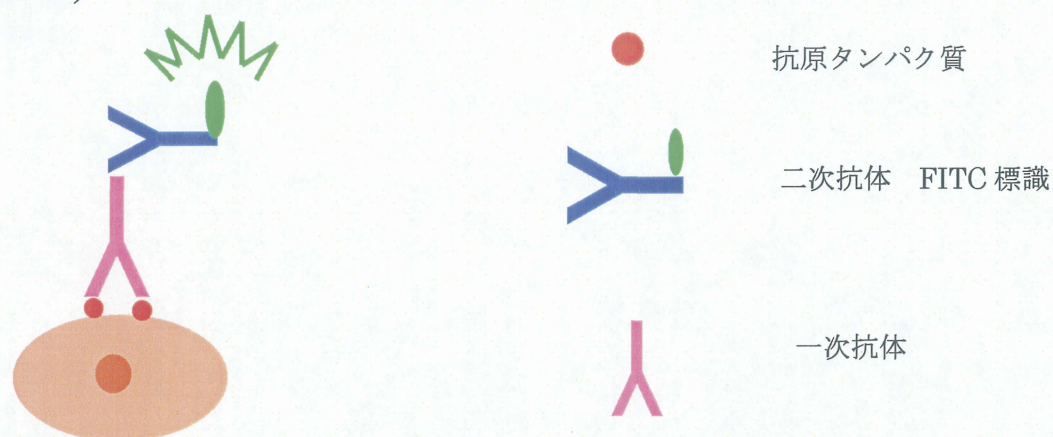


図 8-13 抗原抗体反応を用いた免疫化学染色

・FITC (fluorescein isothiocyanate)

緑色系の蛍光色素で、この色素は安定で、抗体活性を阻害せず、抗体への標識が容易で安定、蛍光効率が低い、最大吸収波長と最大発光波長がかなり離れているなどの標識用蛍光色素の要件をかなり満たしている。

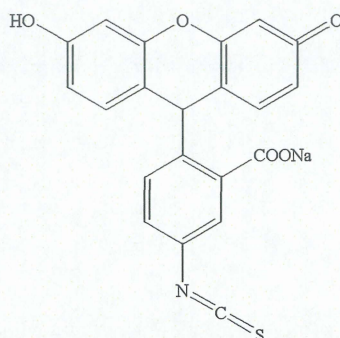


図 8-14 FITC

[試薬]

- ・共焦点レーザー顕微鏡(Fluoview FV1000 倒立顕微鏡 IX81)
- ・Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin Clone 1A4
(Cat. No. M0851/Lot. No. 00004710/Dako)
- ・GOAT ANTI-MOUSE IgG (H+L) FLUORESCCEIN CONJUGATED
SECONDARY ANTIBODY (AP308F/Lot. No. 24110620/WAKO)
- ・propidium iodide(PI)(P4170-25MG/SIGMA)
- ・acetone (WAKO)
- ・methanol (WAKO)
- ・Stromal Cell Basal Medium (SCBMTM) (Lonza/CC-3205)

[操作]

エラスチンゲルで培養した平滑筋細胞の確認(Smooth Muscle Actin、細胞核の染色)

I 溶液の調整

- ① ウシ血清アルブミンを PBS に溶解させ 1 %BSA/PBS を作製した。
- ② acetone と methanol をそれぞれ 1:1 で混合し、acetone/methanol (1:1) 固定液を作製し、-20℃で保管した。

II 免疫蛍光染色

- ① エラスチン溶液を調製し、37℃で 1～2 時間でゲル化させた。
- ② エラスチンゲルに細胞を播種し、24 時間培養した。
- ③ ゲル上の培地を取り除き、細胞を PBS で洗浄した。
- ④ -20℃の acetone/methanol (1:1) にて室温で 5 分間細胞を固定した後、固定液を除き 10 分間風乾した。
- ⑤ 1 %BSA/PBS で 90 分間置換した。
- ⑥ 細胞に 1 ml(希釈:1 %BSA、0.02 %tritonX-100/PBS)の一次抗体(表 8-6)を加え、4℃、飽和湿度で overnight させた。
- ⑦ 一次抗体を吸引除去し、1 %BSA/PBS で 3 回洗浄した。
- ⑧ 二次抗体及び PI 溶液(表 8-2)を 1ml(希釈:1%BSA、0.02%tritonX-100/PBS)加え、90 分間、暗所室温で放置した。
- ⑨ 二次抗体を取り除き 1 %BSA/PBS で 3 回洗浄した後、1 %BSA/PBS 中で overnight させた。
- ⑩ 共焦点レーザー顕微鏡で観察し撮影した。

表 8-6 各抗体の調整

抗体名		希釈率
一次抗体	Monoclonal mouse anti-human SMA	1:200
核染色	propidium iodide(PI)(10 mg/ml)	1:200
二次抗体	Goat anti-Mouse IgG FITC,Cy5,Dylight649	1:200

8-7 BrdU 細胞増殖試験

[原理]

チミジン類似体である BrdU は、S 期細胞の DNA に特異的に取り込まれる。したがって、この BrdU を定量化できれば、放射性物質を使用することなく S 期細胞が DNA 合成を行っているかを判定できる。BrdU が取り込まれなかった部分の DNA の消化はヌクレアーゼ処理により行い、その後 anti-BrdU-POD 抗体で BrdU を認識させる。そして、水溶性の色素前駆体である ABST を加えると、結合した標識抗体である peroxidase がそれを分解し、緑色に可視化する。

[試薬・器具・装置]

- ・ BrdU Labeking&Detection Kit III(ロシュ)
- ・ CS-C Medium(WITHOUT GF)(4Z0-500S/cell systems)
- ・ FBS(EQUITCH-BIO)
- ・ PBS(D8537/SIGMA)
- ・ CO₂ インキュベーター(池本理工工業株式会社)
- ・ ボルテックス(TAITEC)
- ・ 遠心機(KUBOTA2010)(KUBOTA)
- ・ Microplate Reader Model 550(BIO-RAD)
- ・ 吸引ポンプ(BR-21B/日機装)
- ・ エルマ血球計算盤(Erma)
- ・ 96well プレート(MS-8096F/住友ベークライト)

[操作]

I 試薬の調製

- ① BrdU ラベリング試薬を使用直前に PBS 溶液で 1:90 の割合で希釈した。
- ② 濃縮洗浄緩衝液を再蒸留水で 1:10 の割合で希釈し、洗浄緩衝液を調製し、冷蔵(-4℃)で保存した。
- ③ 再蒸留水で希釈した 50%(w/v)グリセリン 1.3ml をヌクレアーゼストック液とし、-20℃で保存した。
- ④ ヌクレアーゼストック液を、使用直前にインキュベーション緩衝液で 1:100 の割合で希釈した。
- ⑤ anti-BrdU-POD 抗体を 1.25ml の再蒸留水で希釈し(最終濃度 20U/ml)、anti-BrdU-POD 抗体ストック液を調製した。
- ⑥ anti-BrdU-POD 抗体ストック液を、使用直前に 10mg/ml の BSA 入りの洗浄緩衝液で 1:100 の割合で希釈し、anti-BrdU-POD 抗体使用液を調製した。

- ⑦ 基質緩衝液に ABTS の粉末を入れ、室温で透明になるまで攪拌し、Peroxidase 基質を調製し、遮光、冷蔵(-4℃)で保存した。
- ⑧ 固定液を調製した。96well プレート 1 枚につき、100%エタノール 7ml を 2.33ml の再蒸留水で希釈し、25%の塩酸を加え、冷凍(-20℃)で保存した。

II BrdU 細胞増殖試験

- ① 96well プレートに細胞を播種し、37℃、5%CO₂ インキュベーター内で 24 時間培養した。
- ② 培養液を吸引後、30%(w/w)エラスチン、Dode-DSP を架橋倍率 3 倍、0.5 倍、0.1 倍、0.05 倍となるように調製した溶液を上から添加し、1 日または 3 日 37℃、5%CO₂ インキュベーター内で培養した。
- ③ 培地 100μl に BrdU ラベリング溶液を 10μl 加え、各 well に添加し、37℃、5%CO₂ インキュベーター内で 12 時間培養した。
- ④ ラベリング溶液含有培地を吸引し、PBS で 2 回洗浄した。
- ⑤ PBS を吸引後、予め冷やしておいた固定液を各 well に 200μl ずつ加え、-20℃で 30 分間細胞を固定した。
- ⑥ 固定液を吸引後、PBS で 3 回洗浄した。
- ⑦ PBS を吸引後、各 well に 100μl のヌクレアーゼ使用液を加え、37℃で 30 分間インキュベートした。
- ⑧ ヌクレアーゼ使用液を吸引後、PBS で 3 回洗浄した。
- ⑨ PBS を吸引後、anti-BrdU-POD 抗体使用液を各 well に 100μl ずつ加え、37℃で 30 分間インキュベートした。
- ⑩ anti-BrdU-POD 抗体使用液を吸引後、洗浄緩衝液で 3 回洗浄した。
- ⑪ 洗浄緩衝液を吸引後、100μl の peroxidase 基質を加え、室温で Positive サンプルが緑色を呈するまで静置した。
- ⑫ 490nm をリファレンスにして、405nm でのサンプルの吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。

8-8 エラスチンゲル細胞培養

[試薬・器具・装置]

- ・ エラスチン A
- ・ Dode-DSP
- ・ 炭酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)
- ・ FBS(EQUITCH-BIO)
- ・ DMEM(SIGMA/D6046)
- ・ シリンジ(テルモ)
- ・ 孔径 0.22 μm フィルター(Millex-GV)(SLGV025LS/MILLIPORE)
- ・ 針18G(テルモ)
- ・ 50ml 遠沈管(IWAKI)
- ・ かぶせ式シリコン栓 Cタイプ(理科研株式会社)
- ・ 5ml アシストチューブ(アシスト)
- ・ 遠心機(2010/KUBOTA)
- ・ CO₂ インキュベーター(池本理化工業)

[操作]

エラスチン溶液の調製

- ① 2%(w/w) エラスチン A 溶液を 0.22 μm フィルターで滅菌し、50ml 遠沈管にシリコン栓をかぶせ、二日間凍結乾燥した。
- ② 滅菌したエラスチン A を濃度が 30%(w/w)となるように量り、10%FBS/DMEM を、Dode-DSP(架橋倍率3倍、0.5倍)を加え、5ml アシストチューブで調製した。溶けにくい場合は遠心機を用いて、遠心(2500rpm、5min)した。

I ゲル上培養

- ① 調製したエラスチン溶液に Na₂CO₃ 溶液を添加し、よく混ぜた後、37°Cで1～2時間インキュベートした。
- ② ゲル化後PBSで表面を洗浄し、細胞を 20～30 $\times 10^4$ cells 播種し、48時間培養した。

II ゲル包埋培養

- ① 調製したエラスチン溶液に Na₂CO₃ 溶液を添加し、よく混ぜた後、細胞懸濁液を加え、再び混ぜ、37°Cで1～2時間インキュベートした。
- ② ゲル化後、PBSで表面を洗浄し、10% FBS/DMEM にゲル全部が浸るようにし、48時間培養した。

8-9 細胞包埋エラスチンゲル伸展培養

[試薬・器具・装置]

- ・ エラスチン A
- ・ Dode-DSP
- ・ 炭酸ナトリウム(和光純薬工業株式会社)
- ・ FBS(EQUITCH-BIO)
- ・ DMEM(SIGMA/D6046)
- ・ シリンジ(テルモ)
- ・ 孔径 0.22 μm フィルター(Millex-GV)(SLGV025LS/MILLIPORE)
- ・ 針 18G(テルモ)
- ・ 50ml 遠沈管(IWAKI)
- ・ かぶせ式シリコン栓 Cタイプ(理科研株式会社)
- ・ 5ml アシストチューブ(アシスト)
- ・ シリコンシート
- ・ $\phi 60$ シャーレ(住友ベークライト)
- ・ CO_2 インキュベーター(池本理化工業)
- ・ 穴あけポンチ
- ・ アナログ計測計算機(アズワン)

[操作]

- ① $\phi 60$ シャーレにシリコンシートを重ねて作製した型を密着させた。
- ② 8-6 で示した方法で作製したエラスチン溶液を直径約 10mm の円形になるようにシリコンシートで作製した型に入れた後、細胞懸濁液を加え、よく混ぜた(10×10^4 cells/gel)。
- ③ 気泡を取り除き、 37°C で1～3時間インキュベートした。
- ④ ゲル化後、PBS で洗浄し、4mm の穴あけポンチで円径のゲルの真ん中をくり抜いた。
- ⑤ 再びPBS で洗浄し、10% FBS/DMEM にゲル全部が浸るようにし、24時間培養した。
- ⑥ 24時間後、伸展培養装置にゲルを設置し、伸展を始めた。
- ⑦ 弾性率を3時間毎に測定しながら24時間伸展培養を行った。

伸展条件は、1 秒毎に 300 μm 引張り、900 μm の点で 5 秒静止し、1 秒毎に 300 μm 戻す。0 μm の点で 5 秒静止させた後、再び 1 秒毎に 300 μm 引っ張った。これを 24 時間繰り返した。伸展後、免疫蛍光染色で観察した。