

平成 23 年度 修士論文

組織工学的人工血管のための高強度
コラーゲン材料の開発

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

熊澤雄基

目次

1 章:緒言	5
1-1 人工血管.....	5
1-1-1 現状の人工血管	
1-1-2 再生医療	
1-1-3 血管の構造	
1-2 細胞外マトリックス.....	8
1-2-1 エラスチン	
1-2-2 コラーゲン	
1-3 高強度コラーゲン材料.....	12
1-4 本研究の目的.....	16
2 章:方法	17
2-1 コラーゲンの調整.....	17
2-1-1 コラーゲンの抽出	
2-1-2 コラーゲンの Type 別分画	
2-2 コラーゲンの同定.....	20
2-2-1 電気泳動法(CBB 染色)	
2-2-2 Western blotting 法	
2-3 コラーゲンゲル作製法.....	21
2-4 コラーゲンフィルム作製法.....	22
2-5 微細構造の観察.....	23
2-6 弾性率測定(圧縮試験).....	26
2-7 膨潤率測定.....	27
2-8 弾性率・伸長率測定(引張り試験).....	28
2-9 高強度コラーゲン材料の作製.....	29
2-9-1 線維配向コラーゲンの作製	
2-9-2 架橋コラーゲンの作製	
2-9-3 III型コラーゲン複合化材料の作製	
2-10 統計分析.....	30
3 章:結果	31
3-1 コラーゲンの調整.....	31
3-2 コラーゲンの同定.....	32

3-2-1 電気泳動法	
3-2-2 Western blotting 法	
3-3 Type 別コラーゲンの力学的特性	35
3-3-1 Type 別コラーゲンゲルの微細構造の観察	
3-3-2 Type 別コラーゲンの弾性率測定(圧縮試験)	
3-3-3 Type 別コラーゲンの膨潤率測定	
3-3-4 Type 別コラーゲンの弾性率測定・伸長率測定(引張り試験)	
3-4 高強度コラーゲン材料の作製	40
3-4-1 線維配向コラーゲンの微細構造の観察	
3-4-2 線維配向コラーゲンの膨潤率測定	
3-4-3 線維配向コラーゲンの弾性率・伸長率測定(引張り試験)	
3-4-4 架橋コラーゲンの膨潤率測定	
3-4-5 架橋コラーゲンの弾性率・伸長率測定(引張り試験)	
3-4-6 III型コラーゲン複合化材料の微細構造の観察	
3-4-7 III型コラーゲン複合化材料の弾性率・伸長率測定(引張り試験)	
3-4-8 フィルム状コラーゲンの弾性率変化(まとめ)	
4 章: 考察	50
・コラーゲンの Type 別分画	50
・コラーゲンの同定	51
・Type 別コラーゲンの力学的特性と微細構造	52
・Type 別コラーゲンの微細構造	55
・線維配向コラーゲンの構造	57
・線維配向コラーゲンの実質濃度、配向度、弾性率の関係	59
・架橋コラーゲンの実質濃度、弾性率の関係	61
・III型コラーゲン複合化材料の弾性率、伸長率	63
・さらなる高強度コラーゲン材料作製のために	64
・エラスチンとの複合化材料	65
5 章: 結論	67
謝辞	68
参考文献	69

付録

- **Western blotting** 法
- 弾性率測定法(圧縮試験)
- 弾性率測定法(引張り試験)
- 走査型電子顕微鏡(SEM)撮影方法

1 章 緒言

1-1 人工血管

人工血管は生体内の修復が追いつかないような重篤な血管の疾病に対して、その傷んだ血管の代替として、または血流を変えるバイパスとして用いられる。血管の代替として用いられる為には、埋め込まれた後、長時間血栓などに塞がれず血液を流し続けることが必要である。

人工血管の開発は 100 年以上前から試み始められた。そして、1952 年に Voorhees¹⁾らは世界で初めて塩化ビニルと酢酸ビニルを重合させた合成繊維を縫いつけることによって、血管の代わりとなる動物実験に成功した。

1-1-1 現状の人工血管

現在の人工血管は主にポリテトラフルオロエチレン、ポリエステルなどの有機合成物からできており、生体適合性が低く、生体からみると異物として認識されてしまう為、血栓の形成が生じてしまう。また、自己組織化により血管内面に新生内膜と呼ばれる膜を形成し、膜が厚くなりすぎると、人工血管を狭め閉塞させてしまう要因にもなりうる。その為、理想的な人工血管の条件には、生体適合性が良く無血栓性である事、劣化しにくく感染に対しても抵抗力がある事、また、安価で利便性が良い事が挙げられる。²⁾

比較的流速の早い大口径の動脈では、その流速により血栓形成を阻止する方法がある。しかし、流速の遅い小口径の血管ではこれらの方法は適用できず、満足な人工血管は完成していないのが現状である。現在、こうした背景をふまえて、細胞外基質を利用した、血栓形成のない人工血管の開発が期待されている。



Fig1-1 人工血管(テフロン製)

1-1-2 再生医療

人体には生体組織や臓器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、病気や事故により大きく損傷を受けた場合、自己修復が困難になる。現在ではそのような損傷に対しては人工臓器や臓器移植による治療が行われている。しかし、人工臓器は完全には生体機能を模倣し切れておらず、臓器移植においては拒絶反応やドナー不足などの問題を抱えている。

再生医療は生体中の細胞を利用することにより、本来人間が備えている自己修復力を生かすことによって、自己組織の再生あるいは臓器機能の代替を行う治療の試みである。この再生医療の3つの重要な要素として、「細胞」・「サイトカイン」・「細胞足場材料」が挙げられる。これらを組み合わせて、細胞を生体組織・臓器の再生へ誘導するための環境を構築する技術を組織工学(Tissue Engineering)と呼ぶ。³⁾

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。⁴⁾

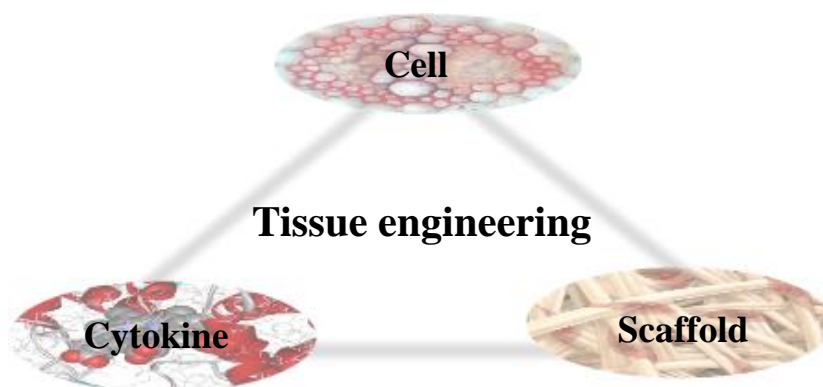


Fig1-2 組織工学

1-1-3 血管の構造

血管は血液を体中へ送るための器官である。血液のほかに酵素や栄養分、老廃物、水分も運ぶ。代謝された毒素を腎臓へ送り解毒を行うため、人体において極めて重要な欠かせない存在であり、軟骨を除く全ての臓器において血管のネットワークが形成されている。また、1分間に約60～70回程度拍動し、血管壁へ血流によるずり応力と血管壁が伸ばされることによる張力が発生している。

血管の中でも主に動脈では基本的に、内膜、中膜、外膜の三重構造から構成さ

れており、その間を弾性板が隔てている。

内膜は血管の一番内側を覆っており、非常に薄く、一層の内皮細胞からなっている。内皮細胞同士は隙間なくくっついており、表面は非常に滑らかで血流をスムーズにしている。内皮細胞は内皮細胞の形態保持や接着のために主にIV、V型コラーゲン、ラミニンやプロテオグリカンから構成される基底膜を足場としている。

中膜は血管にかかる力学的ストレスを配分する役割を持つ。平滑筋は交感神経系の支配を受けており、交換神経が刺激されると平滑筋細胞は収縮して血管系が減少し血管収縮が起こる。逆に平滑筋が緩むと血管系が増大して血管拡張が起こる。血管に対して平行に走る弾性板の間を、血管の円周方向に一様に配向した平滑筋細胞が多層になって存在している。弾性板は中膜中を幾層にも並んで存在し、平滑筋細胞はその間を埋めている。構成するマトリックスとしては主にエラスチンや、III型コラーゲン、マイクロフィブリルを形成するフィブリリンがある。

外膜はI型、III型コラーゲン線維、弾性線維、線維芽細胞、血管や末梢神経から構成されている。外膜におけるコラーゲン線維は配向した状態で存在し、血管の長軸方向への拮抗力を生み出している。血管栄養血管は外膜の中を通り、大動脈などでは中膜まで延びる。しかし、末梢神経は中膜まで到達することなく弾性板で途切れており、そこから神経伝達物質が拡散されていく。また、外膜は周囲の組織の線維と混ざり合うのが一般的で、それにより血管を保持している。⁵⁾

この血管外膜におけるコラーゲン線維の弾性率は約1~10MPaと非常に強固な物質である。

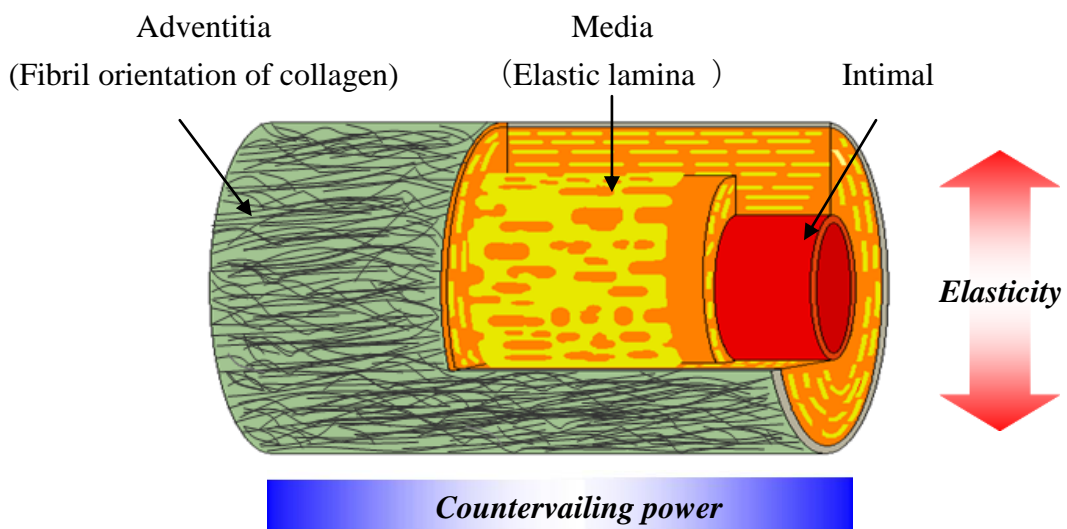


Fig1-3 大動脈模式図

1-2 細胞外マトリックス

細胞外マトリックス(ECM:Extra Cellular Matrix)は生物体内において細胞の外に存在するタンパク質の複雑な構造体のことである。この細胞外マトリックスは、細胞と共に生体組織を構築しており、細胞接着による足場提供、細胞増殖因子等の保持や提供細胞増殖、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。

細胞外マトリックスは、主にコラーゲンやエラスチンといった線維性タンパク質、プロテオグリカンやグリコサミノグリカンといった複合多糖、そしてフィブロネクチンやラミニン等といった接着タンパク質から成っている。

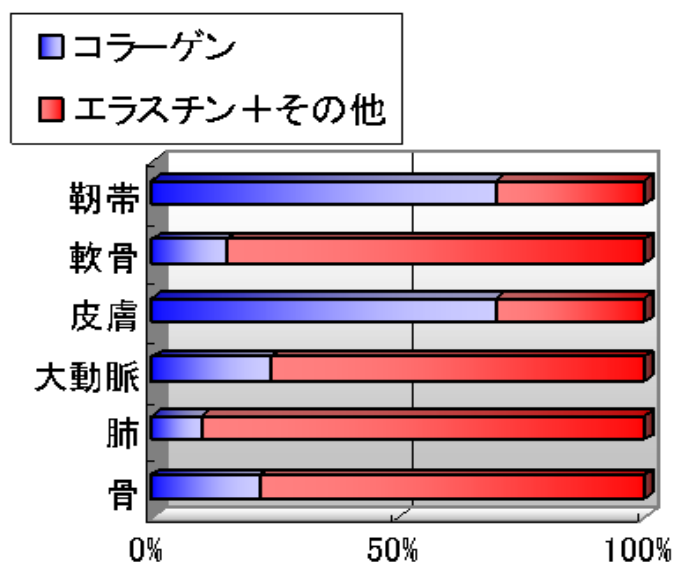


Fig1-4 各生体組織の組成比 ⁶⁾⁷⁾⁸⁾

1-2-1 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、大動脈、靭帯、肺、皮膚、結合組織に発現している。特に、動脈の中膜に多く含まれ、平滑筋細胞との相互関係が注目されている。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、その構造はデスマシン・イソデスマシン等による架橋構造によって、エラスチンの前駆体であるトロポエラスチンが複数個連結された形を取っている。このデスマシンによる架橋はトロポエラスチン中のリシン側鎖が銅イオンとリシルオキシターゼに

よって架橋反応を起こし、4級ピリジニウム環を形成したものであり、4点架橋という強固な構造である。これらの構造を有する為、エラスチンは弾性に富み、熱や酸・アルカリ、プロテアーゼに対して抵抗性を持つ。

Elastin molecule

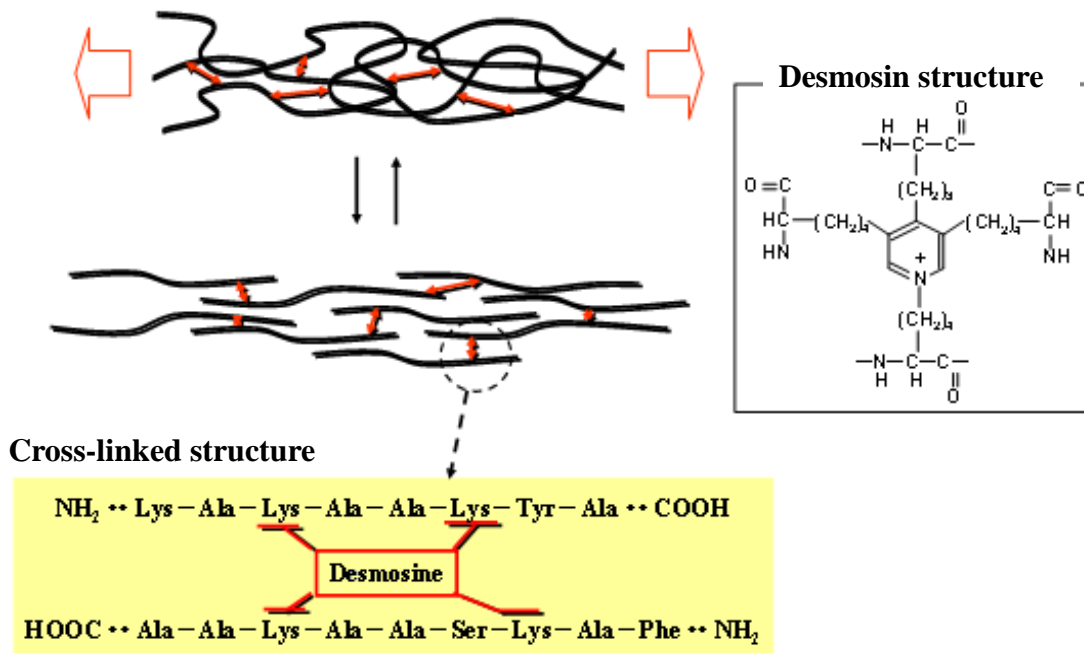


Fig1-5 エラスチンの構造

1-2-2 コラーゲン

コラーゲンは生体内の細胞外マトリックスとして細胞の増殖・分化の調節を行っており、その高い生体親和性から再生医療・組織工学用バイオマテリアル、主に細胞の足場材料として利用されている。また、主要なタンパク質であり、全身のあらゆる臓器に存在し、特に皮膚や骨、軟骨、腱、血管壁、歯などの硬い組織に多く存在している。

コラーゲンは3本のポリペプチド鎖(α鎖)がらせんを巻いた特徴的な構造(コラーゲンヘリックス)をしている。コラーゲン分子の両端にはヘリックス構造を持たないテロペプチドを持つ。テロペプチドは抗原性を示すためバイオマテリアルへ応用する

際にはペプシン処理によってテロペプチドを除去した抗原性の低いアテロコラーゲンが利用される。

1分子あたり分子量が約30万kDa、長さは約300nm、太さは約1.5nmで3本のポリペプチド鎖が絡み合って三重らせんを形成している。ポリペプチド鎖を構成するアミノ酸はグリシンやプロリンが多いが、ヒドロキシプロリンやヒドロキシリシンを含む点で他のタンパク質とは異なる。アミノ酸配列はGly-X-Yの繰り返し構造から成っておりXにはプロリン、Yにはヒドロキシプロリンが頻出する配列をしており、このことが三重らせんをしている要因とされている。

現在では、鎖の違い、存在部位、構成する構造、機能の違いにより29種類のコラーゲンが発見されている。これらの型の異なるコラーゲンは構成ポリペプチド鎖の遺伝情報が異なり、さらに組織中での局在も異なることから、それぞれのTypeのコラーゲンが各々特異的な生物学的機能を有すると考えられる。また物理的機能として中でもI型、III型、V型コラーゲンは結合組織において線維束形成型コラーゲンとして分子間の相互作用により線維の束をつくり存在する。この際ひとつひとつの分子が4分の1ずれて会合し線維を形成する。この自己凝集化によってできた線維は生体組織において力学的強度を担う重要な働きがある。

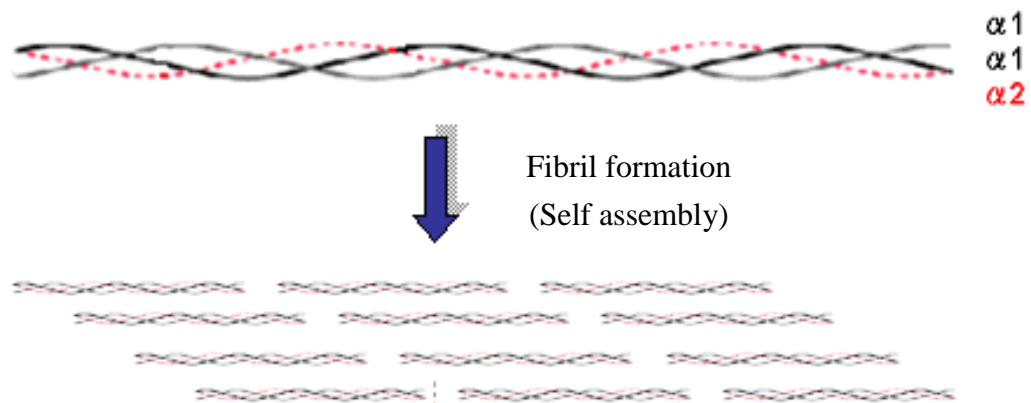


Fig1-6 コラーゲン分子およびコラーゲン線維⁹⁾

しかしながら、人工血管の材料や細胞の足場材料として用いるためのコラーゲンは機械的強度が不十分であり、改良なしではバイオマテリアルとして応用できない^{10) 11)}。生体内におけるコラーゲン線維は配向し、線維間が架橋されている¹²⁾。これに対して、抽出した際にコラーゲンの架橋部位が切断され、また、自己凝集による線維化では配向線維が再現出来ていないのが理由であると考えられている。

そのために、コラーゲンの生物学的能力を維持した上、高強度のコラーゲン材料を作製することが望まれている。

I 型コラーゲン

ほとんどの結合組織において最も豊富に存在する Type のコラーゲンである。最も一般的なコラーゲンで太い線維を作る。真皮、骨など(硝子軟骨を除く全ての結合組織)に多く含まれており、その他のいくつかの Type のコラーゲンと共存している。主に引っ張りに耐え強さを生み出す働きがあり、弾性体の力の伝達に適している。¹³⁾

III型コラーゲン

真皮、動脈壁、肝臓、腱などに含まれており、I 型コラーゲンと共存する 경우가多いがその比率は様々である。骨には全く存在しないが、弾性を有する結合組織には多く存在する。創傷治癒過程の初期段階で発達し、やがて I 型コラーゲンに置き換わることで治癒が進むと言われている。その構造は I 型コラーゲンと類似しているが、細胞の接着・増殖を容易にするため細網線維と呼ばれる細い線維を形成する。¹³⁾¹⁴⁾

1-3 高強度コラーゲン材料

人工血管等の生体組織や組織工学を目的とした足場材料を作製するためには高強度のコラーゲン材料を作製することは欠かすことができない。そのために、大きく分けて2つのアプローチが考えられている。

1-3-1 分子架橋

生体内におけるコラーゲン線維は分子内、分子間で架橋が形成されており、これが高強度の要因の1つである。コラーゲン分子は **non-helical** 部分にあるリシン、又はヒドロキシリシンがリシルオキシターゼによって酸化され、アルデヒド化される。このアルデヒド化されたリシン、ヒドロキシリシンがアルドール縮合によって2分子が結合する。このアルドール縮合による生成物は更に副反応を起こし、ヒスチジンやリシン残基と反応して複雑な架橋生成物を形成する。

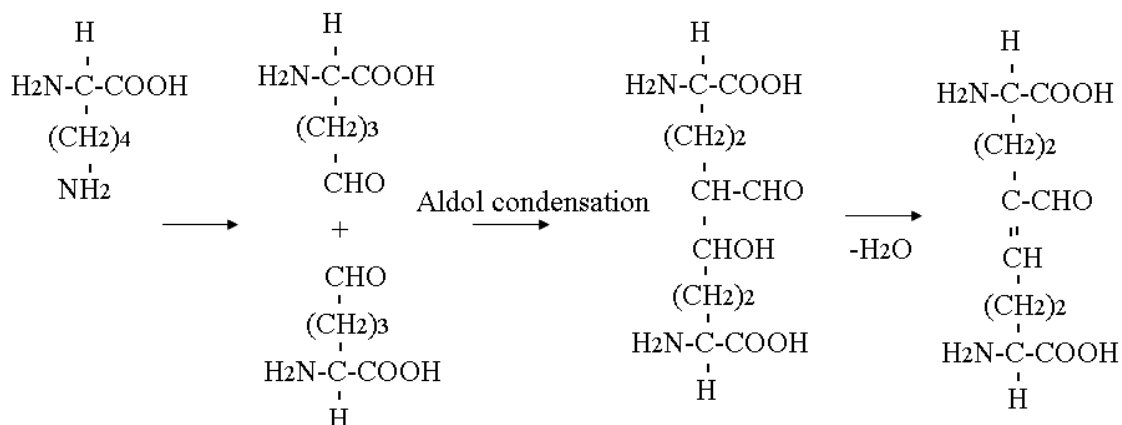


Fig1-7 アルドール縮合

しかし、このような架橋部位はコラーゲンの抽出、又は可溶化の際に切除や破壊されてしまうため、機械的特性を弱めてしまう。そのため、ポリビニルアルコール、ポリアクリル酸、ポリエチレンなどのポリマーが機械的特性の向上をコラーゲンとの良い化学反応性のため生体人工高分子マテリアルとして用いられている。^{15) 16)}

また、化学的架橋法として多く用いられるものとしてグルタルアルデヒドによる架橋法がある。しかし、高い機械的特性、生体内での安定性を上昇させる効果があるものの、架橋剤による毒性、分解制御の困難、副作用などの問題が存在する¹⁷⁾。その他にもゲニピン、トランスグルタミナーゼ、ヒアルロン酸、ヘパリン、コンドロイチン硫酸のような天然高分子の選択が用いられるが、これらの問題解決には至っていないのが現状である^{18) ~23)}。

そのため、現在は一般的な架橋剤として 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)と N-hydroxysuccinimide(NHS)が用いられている。この架橋剤はコラーゲン分子と反応し、コラーゲン分子内、分子間において脱水縮合を誘発する。低い機械的強度ではあるが、副生成物である尿素が洗浄で除去しやすい点や未反応架橋部位が残存しにくい点から用いられ易い²⁴⁾。

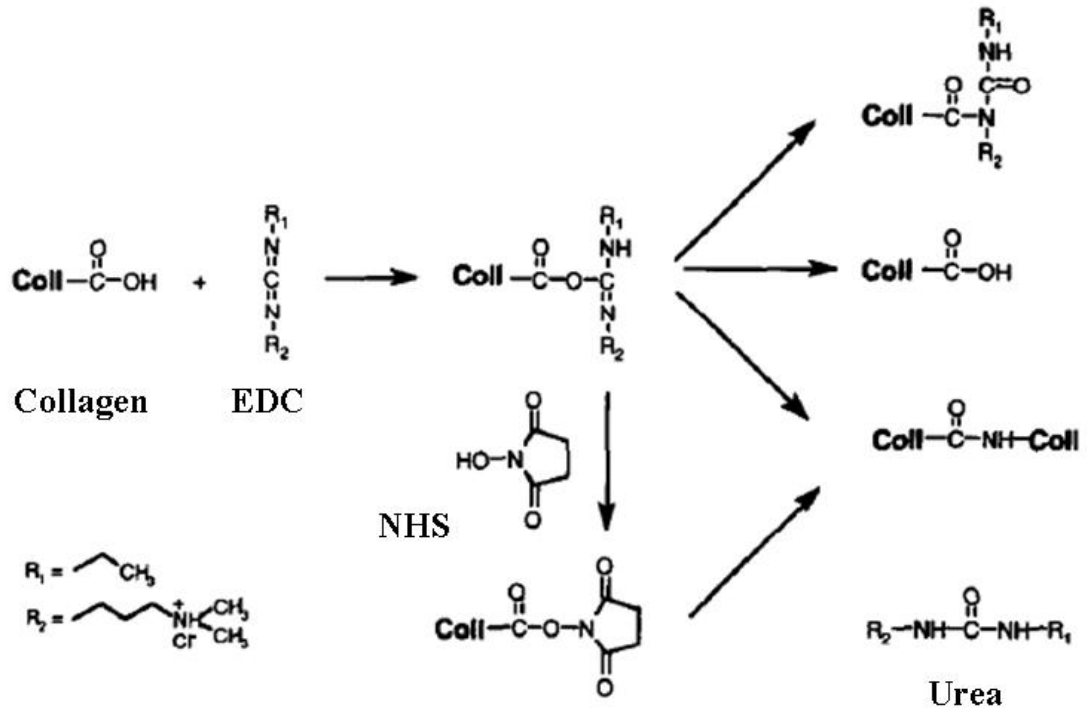


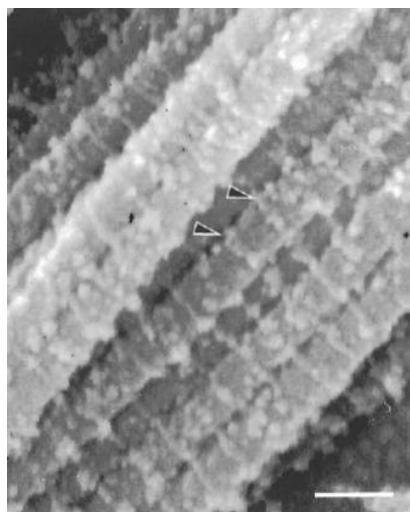
Fig1-8 EDC、NHS による脱水縮合²⁴⁾

1-3-2 構造変化

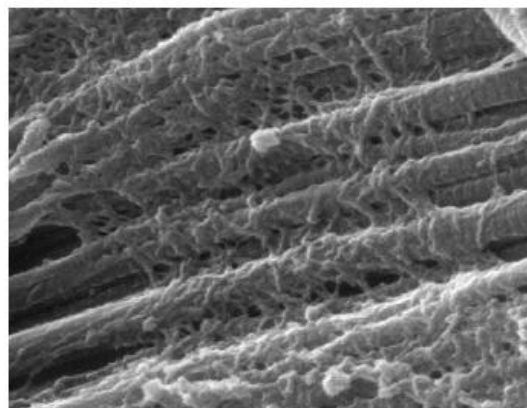
生体内におけるコラーゲン線維は長軸方向への拮抗力を生み出すために、線維が配向した状態で存在している。また、コラーゲンの配向線維は細胞を配向方向へ遊走するための足場としての役割も担っている²⁵⁾。そのため、生体組織の構造を模倣することによるコラーゲンに基づいたバイオマテリアルは機械的特性、生物学的特性を備えることができ、組織再生をさせるための組織工学的足場として有効である。

コラーゲンは細胞内で合成された後、細胞外へ出され、凝集して線維状になる。細胞内の小胞体でプロコラーゲンが合成され、そのプロコラーゲンは細胞膜のヒダや溝へ放出される。それが細線維を適当な方向へ並べる鋳型として機能する。また、コラーゲン基質状にある線維芽細胞は伸展や移動に伴い、接着基質に牽引力を

及ぼし、線維をたぐりよせる。この力によって線維の収縮や配向が生じると考えられている。²⁶⁾²⁷⁾



Adventitia



Tendon

Fig1-9 コラーゲンの線維配向

現在、生体内と同様の線維配向したコラーゲンを作製するために様々な方法によって調査されている。以下に報告されている3種類の方法を簡単示す。

流体²⁸⁾

自己凝集させたコラーゲン溶液を流体の流れに沿って薄膜の層を作る方法である。この方法は配向が容易に作製できることや、装置や試薬を用いないために手軽に作製できる等のメリットがある。しかし、狭範囲のみしか配向させることができないことや低強度等のデメリットがある。

エレクトロスピンニング法²⁹⁾

有機溶媒を混ぜ、電荷を負荷させ、溶液をニードルからアースしたターゲットへ射出させることで線維を作製する方法である。この方法は作製した材料の加工が容易であることや、射出時間や量を調節することにより、線維径を調製することができるメリットがある。しかし、コラーゲン特有の自己凝集線維ではないことや低強度等のデメリットがある。

強磁場³⁰⁾

反磁性異方体、棒状のタンパク質であるコラーゲン分子の特性を活かし、自己凝集させたコラーゲン溶液を強磁場に曝すことで配向させる方法である。この方法は広範囲に配向線維を作製でき、流体やエレクトロスピンング法を用いる方法より有効であると考えられている。また、細胞を包埋したコラーゲンを強磁場に曝すことによってコ配向したコラーゲン線維に沿った細胞の配向も確認されている。しかし、装置が大型・高価等のデメリットがあり実用化には至っていない。

これらの方法は細胞培養用の足場材料として用いることは可能ではあるが、高強度コラーゲン材料を作製するためにはデメリットがある。そのため、新しくコラーゲン線維配向の技術を確立させることが重要になっている。

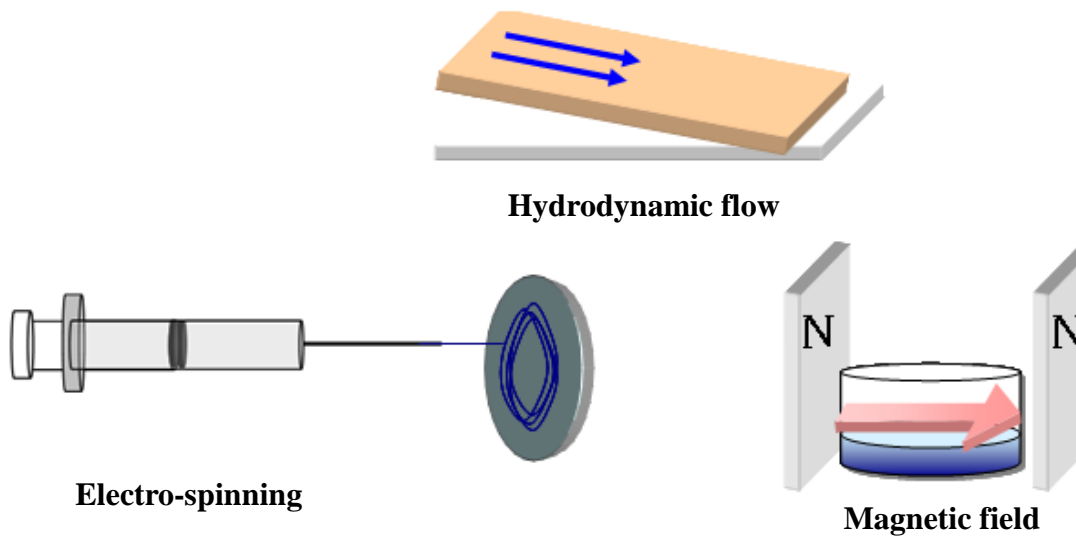


Fig1-10 現在のコラーゲン線維配向技術

1-4 本研究の目的

大動脈の弾性率測定を行うと、その応力-歪曲線は一定以上の歪を加えることで歪に対する応力の増加量が上昇する「J カーブ」と呼ばれる曲線を描く。Fig1-11 は豚大動脈の弾性率測定結果である。Fig 中の①の傾きはエラスチンが寄与したものであり、②の傾きはコラーゲンが寄与したものであると考えられている。このことから、エラスチンはゴムのような働き、コラーゲンはエラスチンのような働きとして大きく生体内組織の力学的強度に関わっていると考えられる。そのため、より生体組織に類似した力学的強度を持つ材料を作製するにはエラスチンとコラーゲンの共存が望ましいと考えられる。

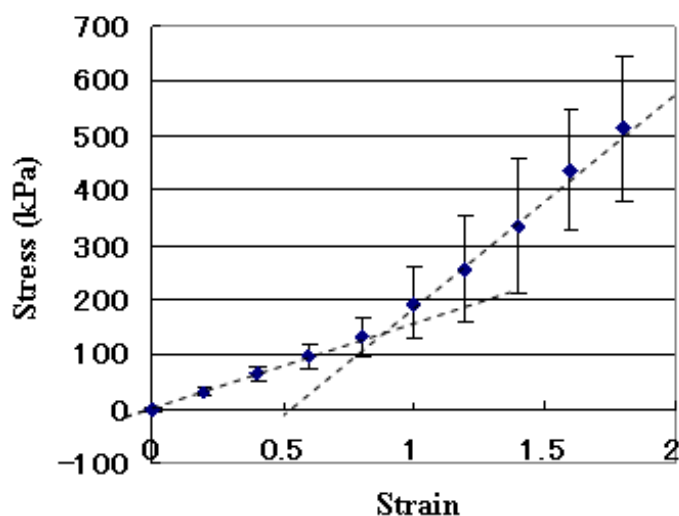


Fig1-11 豚動脈の応力歪み曲線³¹⁾

本来の血管構造を模倣した人工血管作製するためには、血管本来の内膜・中膜・外膜の3層構造を有することや各々に適した基質やその物理学的・生物学的な特異性を再現することが必要である。また、本研究室では弾性に優れる細胞外マトリックスであるエラスチンに着目し、組織工学的な足場材料の研究を行っている。現時点では2種類の混合架橋剤によりエラスチンゲルに、血管中膜弾性板と同程度の力学的強度を持たせた材料の開発に成功している。⁸⁾

そのために、血管中膜はエラスチンゲルを用い、血管外膜はコラーゲンの配向線維を用いて両者の材料を複合化させた人工血管を作製することが望ましいと考えている。

そこで本研究ではコラーゲン単独で血管外膜の機械的強度を有する材料を作製するために、I型、III型コラーゲンの力学的特性の違いを分析し、両者のコラーゲンを用いて力学的強度の高い材料を作製することを目的とした。

2章 方法

2-1 コラーゲンの調整

2-1-1 コラーゲンの抽出

【試薬・機器】

- ・豚大動脈(三重県松阪食肉センター)
- ・塩化ナトリウム(Wako)
- ・酢酸(Wako)
- ・ジエチルエーテル(99.5%) (Wako)
- ・脱イオン水
- ・ペプシン(Wako)
- ・ハサミ
- ・ポリプロピレン手付きビーカー(5L) (NIKKO)
- ・洗濯用メッシュ
- ・ペットボトル
- ・フリーザーバック(Ziploc)
- ・50ml 遠沈管(BIOLOGIX)
- ・500ml 耐圧瓶(APPROX)

【実験操作】

- ① ブタ大動脈血管組織を水道水で洗浄し、血塊や脂質、余分な組織をハサミで切り取り、さらに水道水で洗浄した。
- ② 10%食塩水に付け、一日静置した。
- 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含む外膜を除去した。
- ④ 5%食塩水に入れ洗浄後、脱イオン水で10回程度洗浄した。
- ⑤ 0.5M 酢酸溶液 3000ml に入れた。
- ⑥ コラーゲンの入った酢酸溶液にペプシンを 1mg/ml になるように溶解させ、2週間かき混ぜながら反応させた。
- ⑦ 酵素溶液にて溶解した部分をペットボトルを改良した漏斗にメッシュをかぶせ濾過により回収した。
- ⑧ 濾過液を 50ml 遠沈管に移し、遠心分離を行い、可溶部分と不溶部分に分離し、不溶部分を取り除いた。
※実験操作⑦・⑧にて不溶部分が多い場合は再度実験操作⑤から繰り返した。
- ⑨ 濾過液の 1/10 量のジエチルエーテルを加え滅菌した。
- ⑩ エーテル処理後コラーゲン溶液として冷蔵庫で保存した。

2-1-2 コラーゲンの Type 別分画

各型コラーゲンを未変性のまま分別する方法として、NaCl による分別沈殿が現在最も有力な手段である。これは各型コラーゲンの溶解度が、pH および NaCl 濃度の種々の条件下でお互いに異なることを利用したものである。^{32,33)}

【試薬・機器】

- ・エーテル処理後のコラーゲン溶液
- ・酢酸(Wako)
- ・NaCl(Wako)(ビバホーム)
- ・脱イオン水
- ・50ml 遠沈管(BIOLOGIX)
- ・500ml 耐圧瓶(APPROX)
- ・0.05M Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)
トリスヒドロキシメチルアミノメタン(Wako)
- ・HCl (Wako)
- ・透析用セルロースチューブ(三光純薬株式会社)
- ・遠心分離器 CT 6D(HITACHI)
- ・pH メーターD-50(HORIBA)
- ・凍結乾燥機 FZ-4.5 (LABCONCO)

【実験操作】

- ① 実験方法 2-1-1 「コラーゲンの抽出」で調整したエーテル処理後コラーゲン溶液をそれぞれ 50ml 遠沈管に入れた。
- ② 遠心分離機(3000rpm・5min)にかけてエーテルを分離・除去を数回繰り返した。
- ③ 分離した水溶液に総濃度が 2.0M になるように NaCl を加えた。
- ④ 遠心分離機(3000rpm・5min)にかけた
- ⑤ 生じた沈殿物を同濃度の NaCl 溶液で洗浄をした。
- ⑥ 実験操作④・⑤を数回繰り返した。
- ⑦ 沈殿物を脱イオン水に溶かし、中性付近になるまで数日間透析を行なった。
- ⑧ 透析液を 50ml 遠沈管に移し、4.4M になるように NaCl を加え、遠心分離機(3000rpm・5min)にかけた。
- ⑨ 凝集物を 2.4M NaCl を含む 0.05M の Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)に溶解させ、遠心分離機(4800rpm・5min)にかけた。
- ⑩ 実験操作⑨を数回繰り返し、生じた上澄み溶液を V型コラーゲンとした。
- ⑪ 凝集物を 1.7M NaCl を含む 0.05M の Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)に溶解させ、遠心分離機(4800rpm・5min)にかけた。

- ⑫ 実検操作⑪を数回繰り返し、生じた上澄み溶液を I 型コラーゲン とした。
- ⑬ 凝集物を 1.4M NaCl を含む 0.05M の Tris-HCl 緩衝液(pH7.5)に溶解させ、遠心分離機(4800rpm・5min)にかけた。
- ⑭ 実検操作⑬を数回繰り返し、生じた上澄み溶液を I + III 型コラーゲン とした。
- ⑮ 凝集物を脱イオン水に溶かし、中性付近になるまで数日間透析を行なった。
- ⑯ 透析液を 50ml 遠沈菅に移し、0.02M になるように NaCl を加え、遠心分離機(4800rpm・5min)にかけ、上澄み溶液を III 型コラーゲン とした。
- ⑰ 各 Type 別コラーゲンを透析チューブに入れ、脱イオン水で透析を行った。
- ⑱ 外液の pH が 6 程度になったら耐圧ビンに移し、凍結乾燥を行った。
- ⑲ 乾燥した各 Type 別コラーゲンを得、秤量を行った。

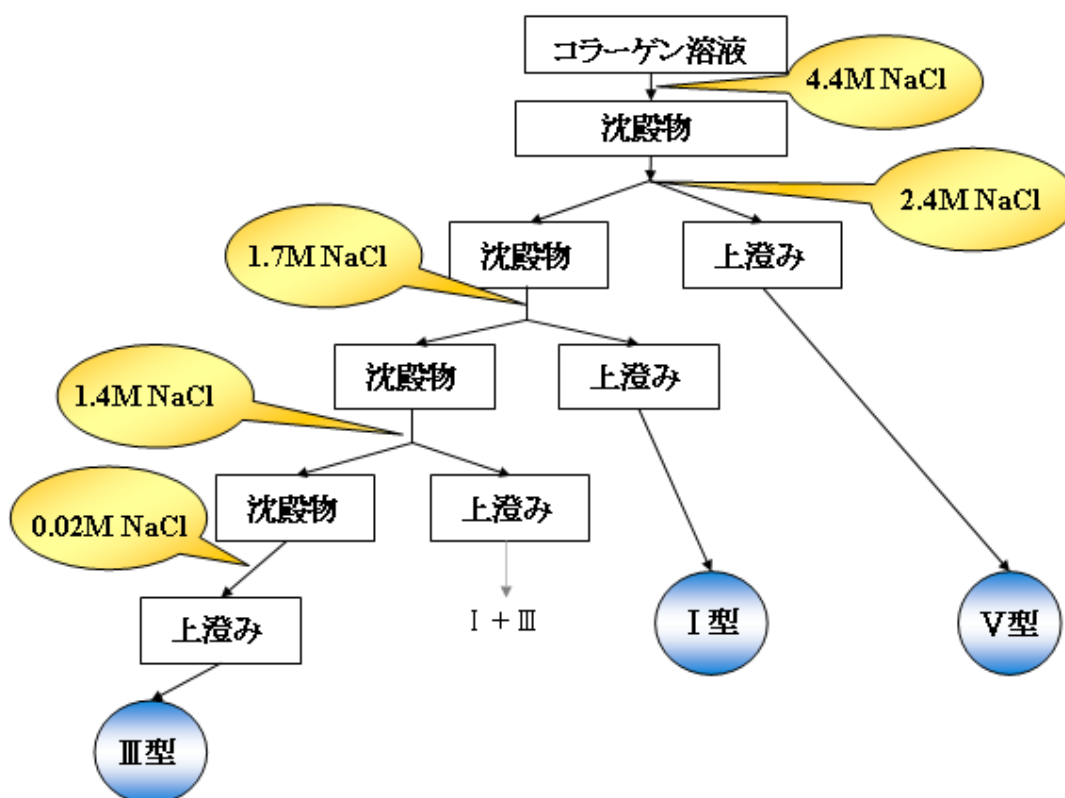


Fig2-1 コラーゲンの Type 別分画

2-2 コラーゲンの同定

※電気泳動法(CBB 染色)・Western blotting 法プロトコルについては付録に記載した。

2-2-1 電気泳動法(CBB 染色)

【試薬・機器】

I 型コラーゲン(新田ゼラチン)※ Positive control として使用

III型コラーゲン(高研)※ Positive control として使用

【実験操作】

- ① 各タイプ別コラーゲンを 1mg/ml になるように 1mM の NaCl に溶解させた。
- ② SDS-PAGE 電気泳動によって分子量ごとにタンパクを分離した。
- ③ 電気泳動後、ゲルを染色液に浸した。
- ④ 脱色液に一晩浸した。
- ⑤ ゲル中のバンドを確認し、ゲルの撮影を行なった。

2-2-1 Western blotting 法

【試薬・機器】

I 型コラーゲン(新田ゼラチン)※ Positive control として使用

III型コラーゲン(高研)※ Positive control として使用

anti-Collagen Type I (Rabbit)Minimum(フナコシ)

anti-Collagen Type III(Rabbit)Minimum(フナコシ)

【実験操作】

- ① 各タイプ別コラーゲンを 1mg/ml になるように 1mM の NaCl に溶解させた。
- ② SDS-PAGE 電気泳動によって分子量ごとにタンパクを分離した。
- ③ ゲル中のタンパクを PVDF 膜へ転写した。
- ④ PVDF 膜上で抗原抗体反応を行った。
- ⑤ 抗体に対して化学発光試薬 ECL を添加した。
- ⑥ ルミノイメージアナライザーによりバンドを検出した。
- ⑦ 画像解析ソフト Image J を用いてバンドの強度の比較を行った。

2-3 コラーゲンゲル作製法

【試薬・機器】

- ・各 Type 別コラーゲン
- ・5ml アシストチューブ (アシスト)
- ・HCl(Wako)
- ・NaOH(Wako)
- ・NaHCO₃(Wako)
- ・HEPES(Wako)
- ・脱イオン水
- ・インキュベータ IC-450PC (アズワン)
- ・ピペットマン

【実験操作】

- ① A 溶液作成:アシストチューブ内において各コラーゲンそれぞれ 4mg に 1mM HCl 水溶液を加え 1.0ml にした。
※氷上で作業を行った。溶解する際粘度が上昇し気泡が発生するが、最終的に遠心分離により取り除いた。
- ② B 溶液作成:NaOH 200mg、NaHCO₃ 3.0g、HEPES 4.89g に脱イオン水を加えて 100ml にした。
- ③ A 溶液に B 溶液 0.25ml を添加した。
- ④ 37°Cインキュベータに入れ 20 分静置させゲル化を確認した。
- ⑤ ゲル化の確認は目視と試験管傾斜法を用いて行った。

2-4 コラーゲンフィルム作製法

【試薬・機器】

- ・各 Type 別コラーゲン
- ・5ml アシストチューブ (アシスト)
- ・HCl(Wako)
- ・NaOH(Wako)
- ・NaHCO₃(Wako)
- ・HEPES(Wako)
- ・脱イオン水
- ・インキュベータ IC-450PC (アズワン)
- ・ピペットマン
- ・シリコン
- ・シリコンシート(厚さ 500 μ m)

【実験操作】

- ① A 溶液作成:アシストチューブ内において各コラーゲンそれぞれ 10mg/ml になるように 1mM HCl に溶解させ調製した。
※氷上で作業を行った。溶解する際粘度が上昇し気泡が発生するが、最終的に遠心分離により取り除いた。
- ② B 溶液作成:NaOH 200mg、NaHCO₃ 3.0g、HEPES 4.89g に脱イオン水を加えて 100ml にした。
- ③ シリコンとシリコンシートで作った鋳型 (Fig2-4 参照) に A 溶液を 800 μ l 流し入れた。
- ④ B 溶液を 200 μ l 添加した。
- ⑤ 37 $^{\circ}$ Cインキュベータに入れ 20 分静置させゲル化を確認した。
- ⑥ そのまま 37 $^{\circ}$ Cインキュベータ内で 24h 乾燥させた後、フィルム化を確認した。

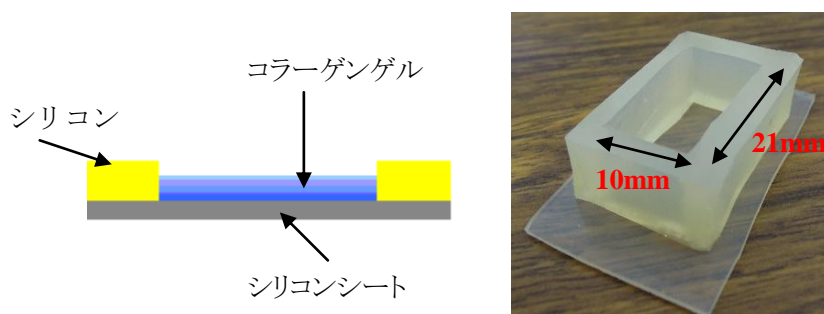


Fig2-2 フィルム作製用鋳型

左:断面図 右:上部写真

2-5 微細構造の観察

2-5-1 サンプルがゲル状の場合(水分を含む場合)

【試薬・機器】

- ・サンプル(コラーゲンゲル)
- ・pH7.4 リン酸バッファー
Na₂PO₄・2H₂O(Wako)
Na₂HPO₄(Wako)
- ・グルタルアルデヒド(東京化成)
- ・四酸化オスミウム(ナカライテスク)
- ・99.5% EtOH (Wako)
- ・t-BuOH(ナカライテスク)
- ・24well プレート(SUMILON)
- ・t-ブチルアルコール用凍結乾燥機 VED-21S (Vacuum device inc.)
- ・日立走査型電子顕微鏡 S4000(日立)
- ・日立イオンスパッターE1010(日立)
- ・サンプル瓶
- ・10ml ガラスピペット
- ・ピペットマン
- ・インキュベータ IC-450PC(アズワン)

【実験操作】

- ① サンプルを液体窒素で凍結させて割り、内部を露出させておいた。(表面構造の撮影を行う場合はこの工程は飛ばす)
- ② サンプルを 24well プレートにいれ、リン酸バッファーで洗浄した。
- ③ 2.5%グルタルアルデヒドにサンプルを浸し、2h 前固定を行った。
- ④ リン酸バッファーにサンプルを浸し、15min 静置することで洗浄した。これを4回繰り返した。
- ⑤ 50,70,90,99%EtOH に各 10min サンプルを浸し、段階的に脱水を行った。
- ⑥ サンプルをサンプル瓶に移した後、t-BuOH:EtOH=1:1 の溶液に浸し、37°Cインキュベータ内で 15min 静置した。
- ⑦ 99%t-BuOH にサンプルを浸し、37°Cインキュベータ内で 30min 静置し、置換した。これを2回繰り返した。
- ⑧ t-BuOH でサンプルを浸し、冷蔵庫に入れ凍結させた。
- ⑨ t-BuOH 用凍結乾燥機で凍結乾燥を行った。

⑩ サンプルにイオンスパッターで金コートを施した後に、SEM 撮影を行った。(実験)

日が空いた場合は、デシケーター内でサンプルを保管した)

⑪ SEM で撮影された画像の解析を行った。

※⑤～⑦の作業は全てドラフト内で行い、オスmium廃液とグルタルアルデヒド廃液は所定の場所で保管した。



t-BuOH 用凍結乾燥機



イオンスパッター



走査型電子顕微鏡



Fig2-3 各機器

2-5-2 サンプルがフィルム状の場合(水分を含まない場合)

【試薬・機器】

- ・サンプル(コラーゲンフィルム)
- ・PBS(pH7.4)
 - KH₂PO₄ (Wako)
 - KCl (Wako)
 - NaH₂PO₄・12H₂O(Wako)
 - NaCl (Wako)
- ・5ml アシストチューブ(アシスト)
- ・凍結乾燥機 FZ-4.5 (LABCONCO)

【実験操作】

- ① コラーゲンフィルムを PBS に 50min 浸し膨潤させた。
- ② 脱イオン水に浸し、軽く洗浄した。
- ③ 膨潤したコラーゲンフィルムをアシストチューブ内に入れ、液体窒素で凍結させた。
- ④ 凍結乾燥をさせた。
- ⑤ サンプルにイオンスパッターで金コートを施した後に、SEM 撮影を行った。
- ⑥ SEM で撮影された画像の解析を行った。

2-6 弾性率測定(圧縮試験)

【試薬・機器】

- ・サンプル(コラーゲンゲル)
- ・弾性率測定装置(付録参照)
- ・アナログ計測計算機(アズワン)

【実験操作】

- ① サンプルの自然長 $L_0(\text{m})$ を測定した。
- ② サンプルを試料台へセットした。
- ③ 測定前のサンプルに力がかからないように調節した。
- ⑤ 弾性率測定装置により、サンプルをリニアアクチュエーターにより圧縮させ、その際動歪み計測器に表示される圧縮力をアナログ計測計算機に読み取らせた。
- ④ 弾性率を応力-歪曲線より算出した。

$$\frac{F(\text{N}) / A(\text{m}^2)}{\Delta L(\text{m}) / L(\text{m})} = \text{弾性率 (Pa)}$$

※弾性率測定(圧縮試験)方法については付録に記載した。

2-7 膨潤率測定

【試薬・機器】

- ・サンプル
- ・PBS(pH7.4)
 - KH₂PO₄ (Wako)
 - KCl (Wako)
 - NaH₂PO₄・12H₂O(Wako)
 - NaCl (Wako)

【実験操作】

- ① 乾燥したコラーゲンフィルムの重量を測定した。
- ② コラーゲンフィルムを 37℃の PBS に浸した。
- ③ 時間ごとにコラーゲンフィルムの重量を測定した。
- ④ 膨潤率が一定になるまで測定した。
- ⑤ 重量膨潤率とゲルとしての実質濃度を算出した。

重量膨潤率 $S(\%) = (W_h - W_d) / W_d \times 100$ W_h : 水和重量(g)

実質濃度 $(\%) = (1 / W_h) \times 100$ W_d : 乾燥重量(g)

2-8 弾性率・伸長率測定(引張り試験)

【試薬・機器】

- ・サンプル
- ・弾性率測定装置(付録参照)
- ・アナログ計測計算機(アズワン)

【実験操作】

- ① サンプルを PBS に 30min 以上浸し膨潤させた。
- ② サンプルの両端にスペーサーを付け、試料台へセットした。
- ③ サンプルが常に PBS 水(37℃)に浸るようにした。
- ④ 測定前のゲルに力がかからないように調節し、その時のスペーサー間のサンプル間の自然長 $L_0(m)$ を測定した。
- ⑤ サンプルを 1 秒間に 0.5mm ずつリニアアクチュエーターで引張り、その際、動歪み計測器に表記される張力をアナログ計測計算機に読み取らせた。
- ⑥ サンプルが破断するまで測定し続け、計測値から応力と歪を計算し、応力-歪曲線から弾性率を算出した。また、自然長に対する破断時の伸びから伸長率を算出した。

$$\frac{F(N) / A(m)}{\Delta L(m) / L(m)} = \text{弾性率 (Pa)} \quad \frac{\Delta L(m)}{L(m)} \times 100 = \text{伸長率 (\%)}$$

※弾性率測定(引張り試験)方法については付録に記載した。

2-9 高強度コラーゲン材料の作製

2-9-1 線維配向コラーゲンの作製

【試薬・機器】

- ・サンプル(I 型コラーゲンフィルム 方法 2-4 にて作製)
- ・PBS(pH7.4)
 - KH₂PO₄ (Wako)
 - KCl (Wako)
 - NaH₂PO₄・12H₂O(Wako)
 - NaCl (Wako)
- ・弾性率測定装置(付録参照)
- ・アナログ計測計算機(アズワン)

【実験操作】

- ① 方法 2-4 で作製したコラーゲンフィルムを PBS に 50min 以上浸し膨潤させた。
- ② サンプルの両端にスペーサーを付け、試料台へセットした。
- ③ サンプルが常に PBS 水(37°C)に浸るようにした。
- ④ 測定前のゲルに力がかからないように調節し、その時のスペーサー間のサンプル間の自然長 $L_0(m)$ を測定した。
- ⑤ サンプルを 1 秒間に 0.5mm ずつリニアアクチュエーターで自然長に対して 0~35%引張り、歪をかけたまま固定させた。
- ⑥ 浸っていた PBS を外し、室温で乾燥させた。

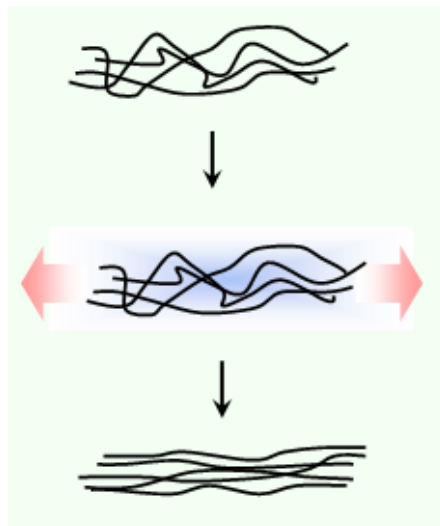


Fig2-4 線維配向コラーゲンの作製

2-9-2 架橋コラーゲンの作製

【試薬・機器】

- ・サンプル
- ・PBS(pH7.4)
 - KH₂PO₄ (Wako)
 - KCl (Wako)
 - NaH₂PO₄・12H₂O(Wako)
 - NaCl (Wako)
- ・EDC 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(ペプチド研究所)
- ・NHS N-hydroxysuccinimide(ペプチド研究所)

【実験操作】

- ① サンプルの乾燥重量を測定した。
- ② EDC と NHS をモル比が EDC:NHS:COOH=5:5:1 になるように PBS 中に溶解させた。
- ③ サンプルを EDC と NHS を溶解させた溶液に浸し、37°C で over night させた。
- ④ サンプルを取り出し、乾燥させた。

2-9-3 III型コラーゲン複合化材料の作製

【試薬・機器】

- ・サンプル
- ・III型コラーゲン
- ・HCl(Wako)

【実験操作】

- ① III型コラーゲンを 1.0mg/ml になるように 1mM HCl に溶解させた。
 - ② 方法 2-3 で作製した B 溶液を加え最終濃度 0.8mg/ml になるように中和した。
 - ③ 方法 2-9-1 で作製した線維配向コラーゲンフィルムを 30min 以上浸した。
 - ④ サンプルを取り出し、37°C インキュベータに入れ、乾燥させた。
- ※①~③は氷上で作業を行なった。

2-10 統計分析

統計的な有意性は StatView®-J 5.0(SAS 社)を使用した。解析には Tukey-Kramer 法を用いた。P 値<0.05 の時に有意差があると判断し、「*」で表記した。

3 章 結果

3-1 コラーゲンの調整

研究材料となるコラーゲンを豚の血管外膜より抽出した。血管外膜コラーゲンは主に I 型、III 型、V 型コラーゲンが共存しているため、塩析出法によって分画を行なった。血管外膜からの抽出総収量を Table3-1 に示し、各 NaCl 濃度における各 Type のコラーゲンとその収率を Table3-2 に示した。

Table3-1 血管外膜からのコラーゲンの収率

Lot	Adventitia(g)	Type I (g)	Type I +III(g)	TypeIII(g)	Type V (g)
1	12.9	0.17	0.09	0.03	0.06
2	26.2	0.356	0.152	0.065	0.107
3	60.1	0.771	0.311	0.057	0.130
4	198.1	1.319	1.353	0.102	0.410

Total weight(g)	Yield (%)
0.35	2.7
0.680	2.6
1.269	2.1
3.184	1.6

平均収率 2.25%となった。出発材料である血管外膜の重量を大きくすると収率が下がる傾向があった。

Table 3-2 各 Type 別コラーゲンの収率

	Range of NaCl concentration (M)	Yield (%)
TypeVcollagen	2.4~4.4	14.0
Type I collagen	1.7~2.4	50.8
Type I + IIIcollagen	1.4~1.7	28.8
TypeIIIcollagen	0.02~1.4	6.4

各 NaCl 濃度にて可溶化し、分画したコラーゲンを各 Type のコラーゲンとした。各 NaCl 濃度の違いによって上澄みと凝集物を確認することができ、分画することができた。収率から I 型コラーゲンは大部分を占めており、III 型、V 型コラーゲンは

少量しか含まれていなかった。また、V型コラーゲンの分画はより純度の高いI型、III型コラーゲンを得るために行なった。以後、実験結果 3-1 で得られたI型、III型コラーゲンを研究材料として用いた。

3-2 コラーゲンの同定

3-2-1 電気泳動法

各 Type 別コラーゲンについて抽出、分別できているかを確認するために SDS-PAGE を行い CBB 染色により確認を行なった。染色結果を Fig3-1 へ示した。

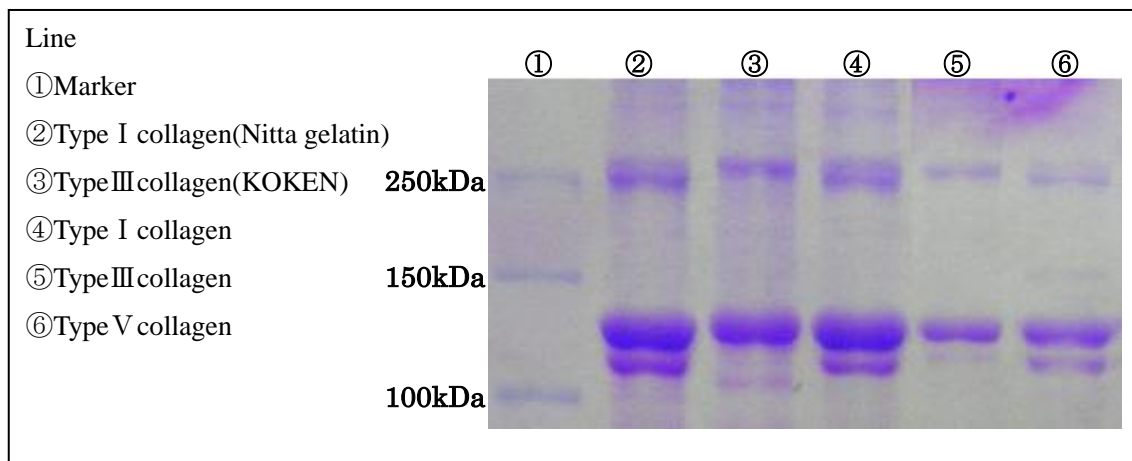


Fig3-1 各コラーゲンの分画

コラーゲンの3重螺旋構造は作業中の煮沸とジスルフィド結合の切断により分子量約100kDaの1本鎖へとほどける。

I型コラーゲンの分子鎖は $\alpha 1 \times 2$ 、 $\alpha 2 \times 1$ のため2本のバンド、また、III型コラーゲンの分子鎖は $\alpha 1 \times 3$ のため1本のバンドが各々100kDa付近へ検出される。V型コラーゲンの分子鎖は $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ であり140k~180kDa付近にバンドが検出される。

Fig3-2-1より抽出したレーン④のI型コラーゲンとレーン⑤のIII型コラーゲンは適した位置に適した数のバンドが検出された。また、レーン⑥のV型コラーゲンの140kDa~180kDaに検出されたバンドが他のレーンにおいて検出されなかった。

以上より、抽出したI型コラーゲン、III型コラーゲンは純度よく精製できたといえる。

3-2-2 Western blotting 法

抽出したコラーゲンが I 型コラーゲンと III 型コラーゲンであることを同定するために、I 型コラーゲン抗体、III 型コラーゲン抗体を用いて確認を行った。

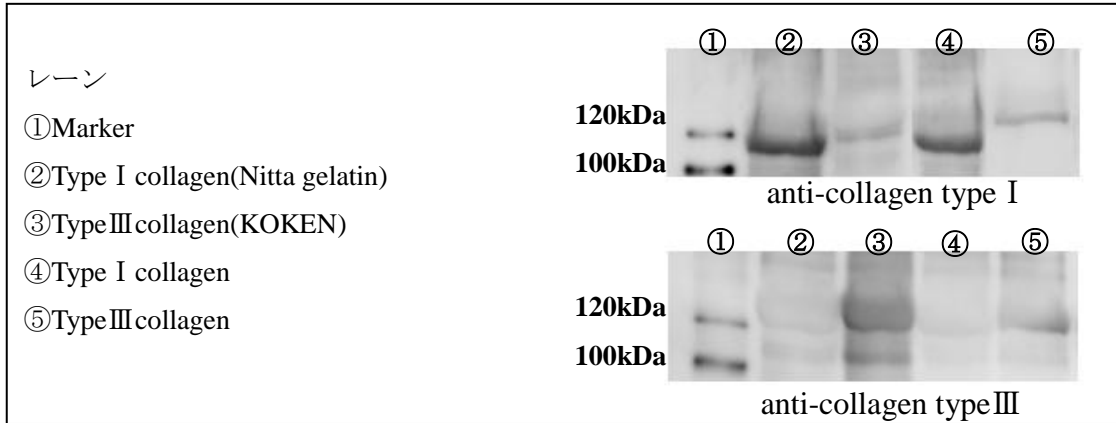


Fig 3-2 各コラーゲンの同定

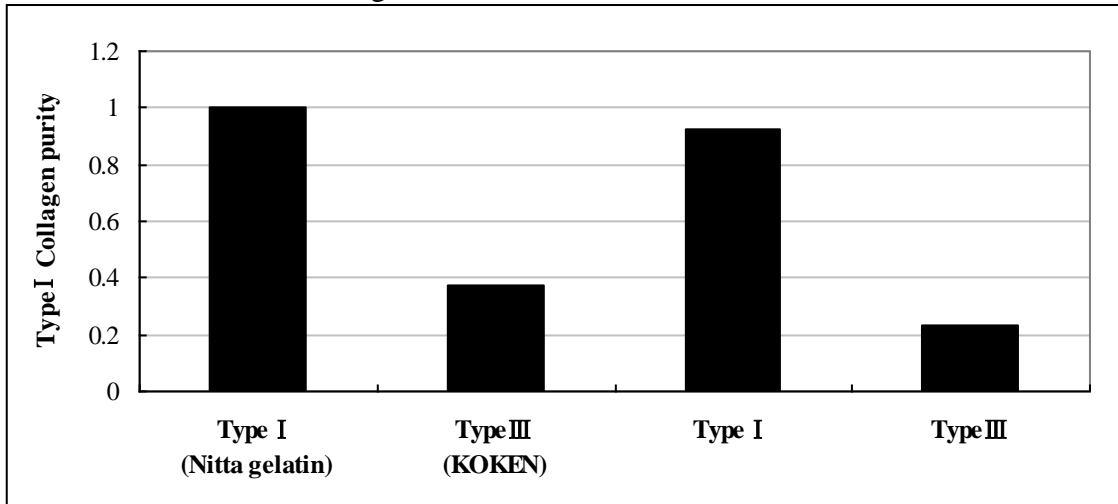


Fig3-3 I 型コラーゲンの純度

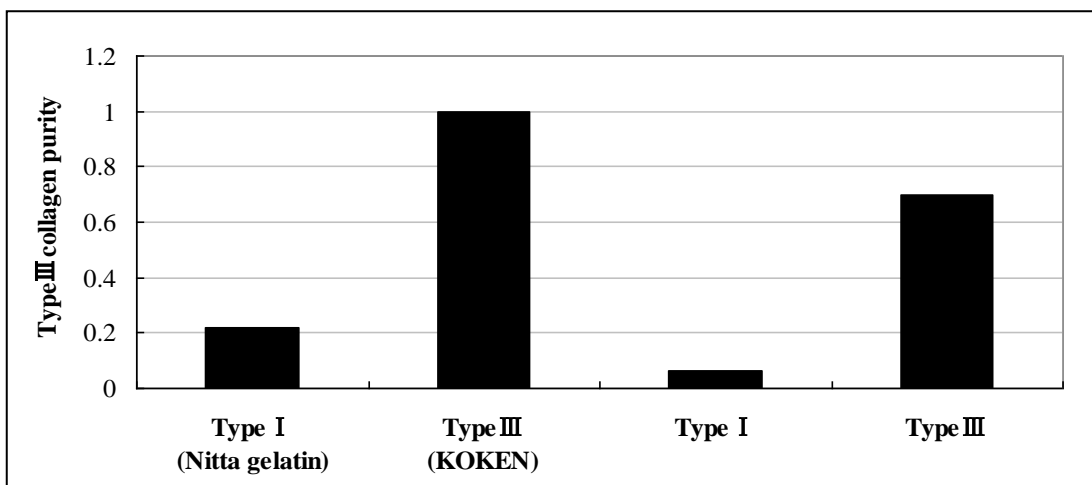


Fig3-4 III型コラーゲンの純度

Fig3-2 より各々のコラーゲンの抗体に対してバンドが検出されたために、抽出物は I 型、III型コラーゲンであることが確認できた。

Fig3-3 は anti-collagen type I を用い、各々のコラーゲンの発光強度をポジティブコントロールとして用いた I 型コラーゲン(新田ゼラチン)に対してプロットしたグラフである。抽出した I 型コラーゲンはポジティブコントロール同様の純度であり、III型コラーゲンはネガティブコントロールであるIII型コラーゲン(KOKEN)よりも I 型コラーゲンを含んでいない結果となった。

また、Fig3-4 は anti-collagen type III を用い、各々のコラーゲンの発光強度をポジティブコントロールとして用いた III型コラーゲン(KOKEN)に対してプロットしたグラフである。抽出した III型コラーゲンはポジティブコントロール同様の純度であり、I 型コラーゲンはネガティブコントロールである I 型コラーゲン(新田ゼラチン)よりも III型コラーゲンを含んでいない結果となった。

以上より、Fig3-1 と同様に抽出したコラーゲンは他の種類のコラーゲンを含まない、純度が高いものが精製できたといえる。

3-3 Type 別コラーゲンの力学的特性

3-3-1 Type 別コラーゲンゲルの微細構造の観察

コラーゲンの微細構造を SEM によって観察した。

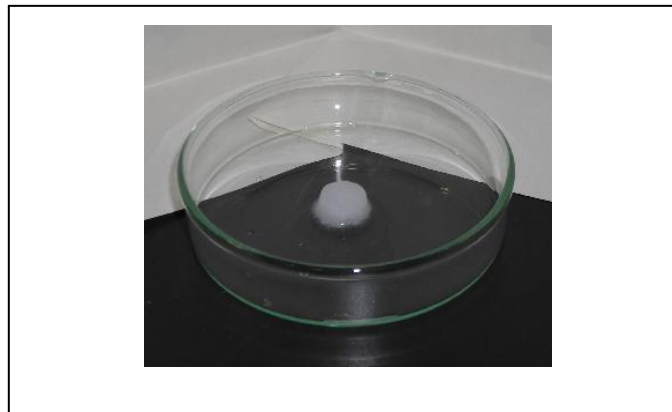


Fig3-5 コラーゲンゲル写真

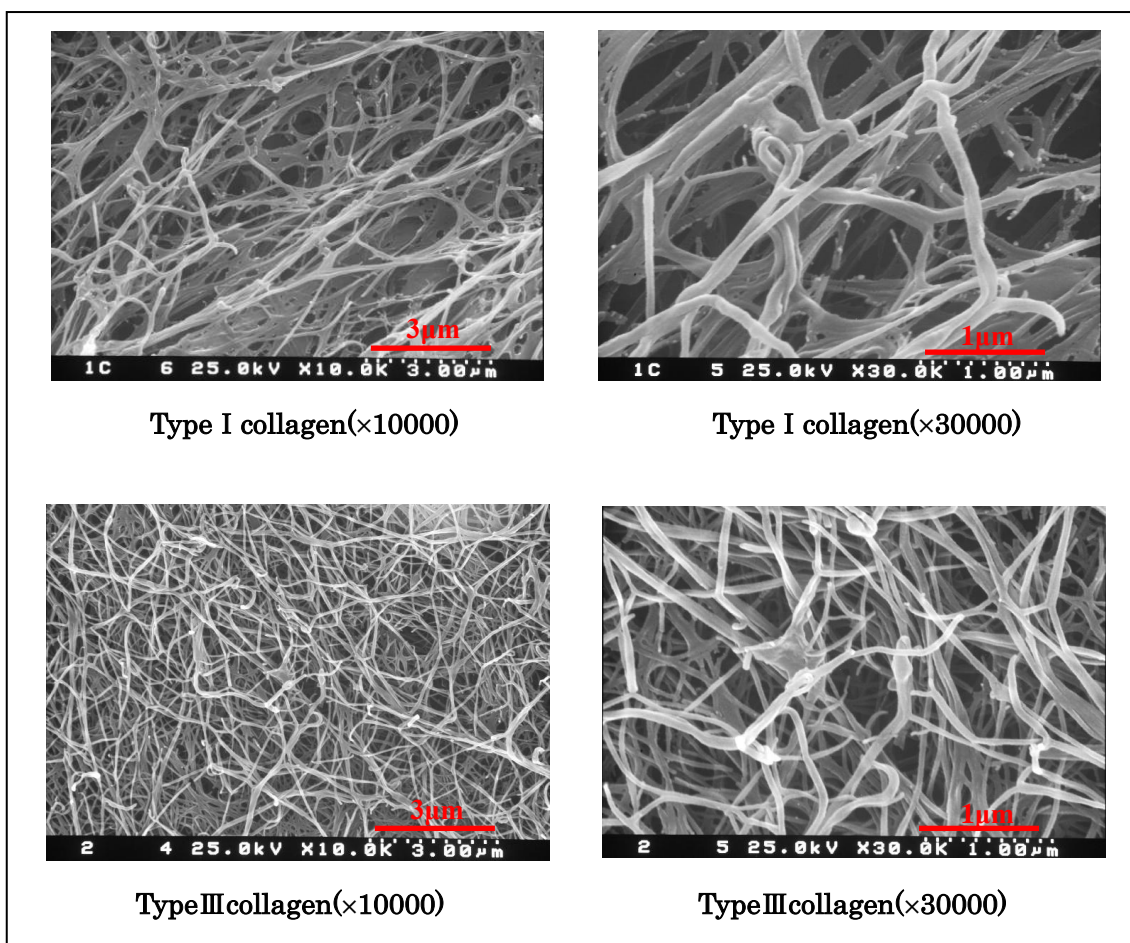


Fig 3-6 コラーゲンゲルの微細構造

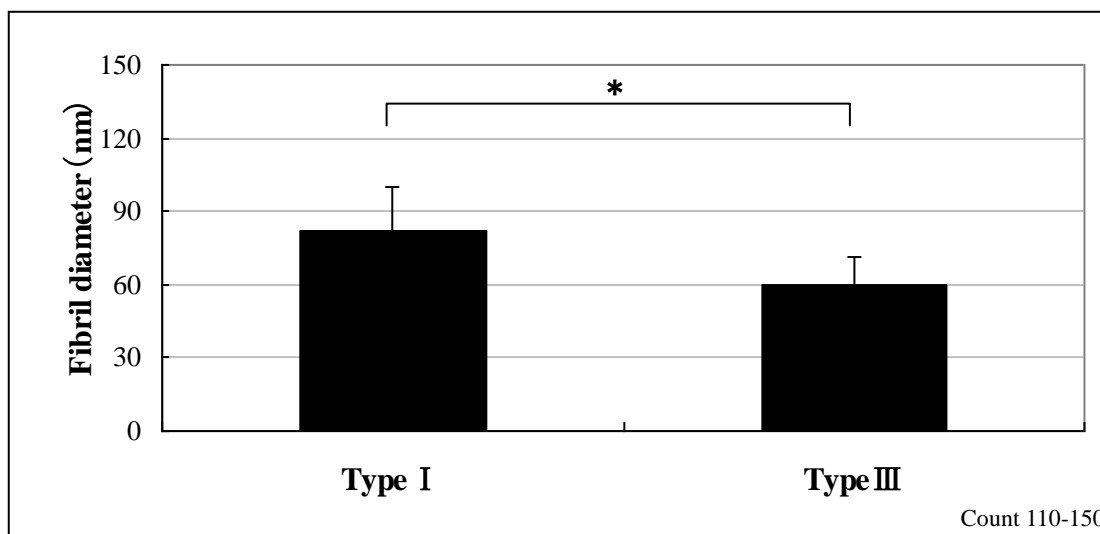


Fig3-7 各コラーゲンの線維径

各コラーゲン濃度を 3.2mg/ml に調製した。コラーゲン溶液を中和後、37°Cで静置させることで直ちに白濁が生じ、粘性が増加した。20分後に試験管傾斜法によってゲル化の有無を確認した。Fig3-5よりコラーゲンゲルは目視では白濁しておりI型、III型コラーゲンによる差は生じなかった。

Fig3-6よりコラーゲンゲルの微細構造は線維が全体にランダムに配置していた。またFig3-7より、コラーゲンの線維径はI型コラーゲンが82±18nm、III型コラーゲンが60±11nmであった。そのため、I型コラーゲンが太い線維、III型コラーゲンが細い線維であることが確認された。

3-3-2 Type別コラーゲンの弾性率測定(圧縮試験)

コラーゲンゲルの弾性率を測定した。

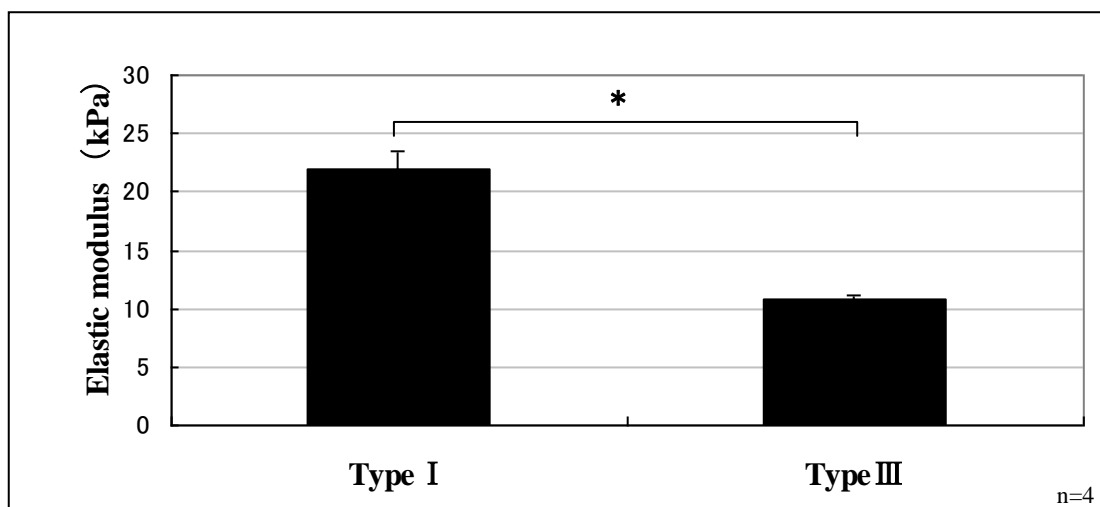


Fig3-8 各コラーゲンの弾性率(圧縮)

各コラーゲングル濃度を 8mg/ml に調製し、弾性率を圧縮試験により測定した。Fig3-8 より I 型コラーゲンが $22 \pm 1.4\text{kPa}$ 、III型コラーゲンが $11 \pm 0.4\text{kPa}$ であった。そのため、I 型コラーゲンはIII型コラーゲンより圧縮に対して強いゲルであることが確認された。

3-3-3 Type 別コラーゲンの膨潤率測定

コラーゲンフィルムの膨潤率を測定し、ゲルとしての実質濃度を算出した。

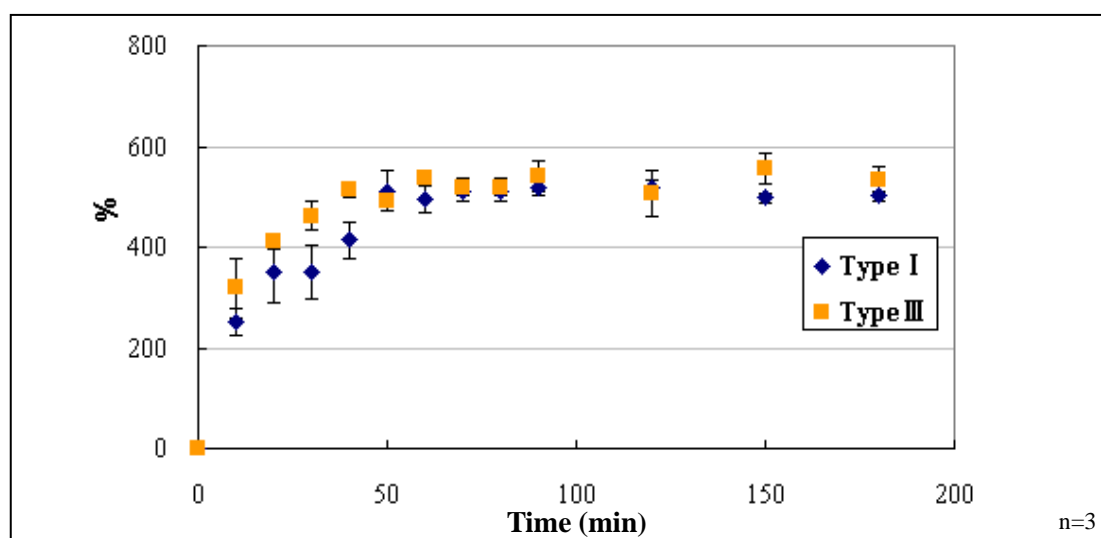


Fig3-9 各コラーゲンの膨潤率

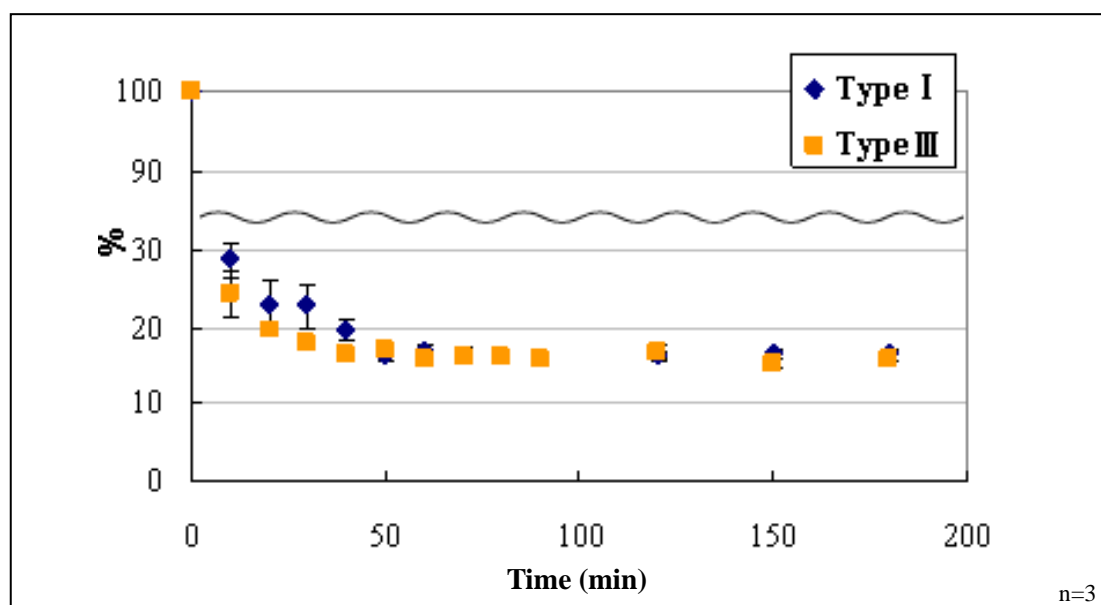


Fig3-10 各コラーゲンの実質濃度

I 型、III型コラーゲンフィルムの重量膨潤率を測定した。乾燥重量を0minとし、フィルムを PBS 中に浸して時間ごとに重量を測定した。そこから重量膨潤率を算出した。Fig3-9 より、膨潤率が一定になるまでは少し差が生じたが、どちらも約 50min ほどで一定となった。重量膨潤率は I 型コラーゲンが $508 \pm 10.0\%$ 、III型コラーゲンが $527 \pm 17.2\%$ となり、実質濃度に算出(Fig3-10)すると I 型コラーゲンが約 16.4% ゲル、III型コラーゲンが約 15.7% ゲルとなった。重量膨潤率および実質濃度はどちらもほぼ同じ値となった。

3-3-4 Type 別コラーゲンの弾性率測定・伸長率測定(引張り試験)

I 型、III型コラーゲンフィルムの弾性率、伸長率を引張り試験により測定した。

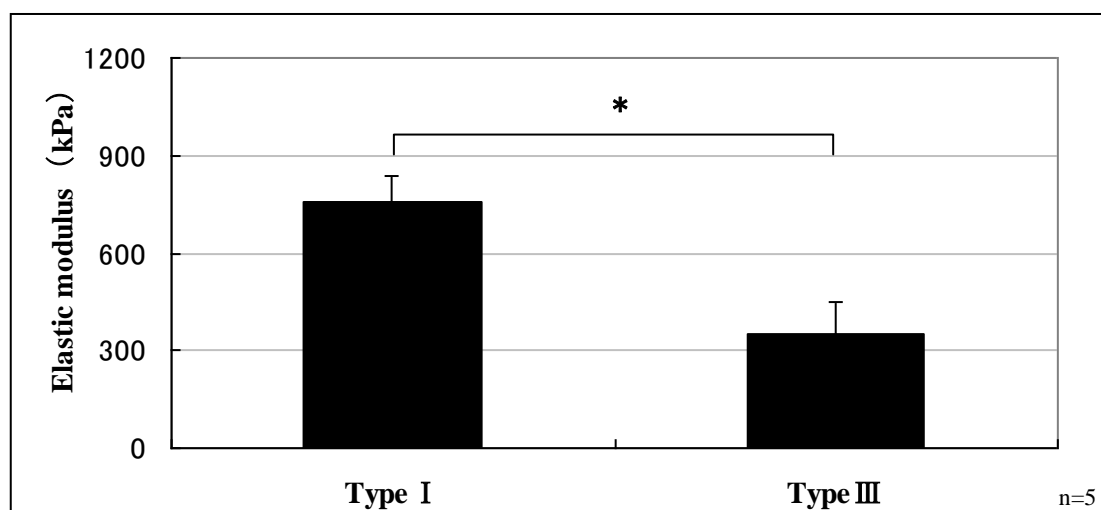


Fig3-11 各コラーゲンの弾性率(引張り)

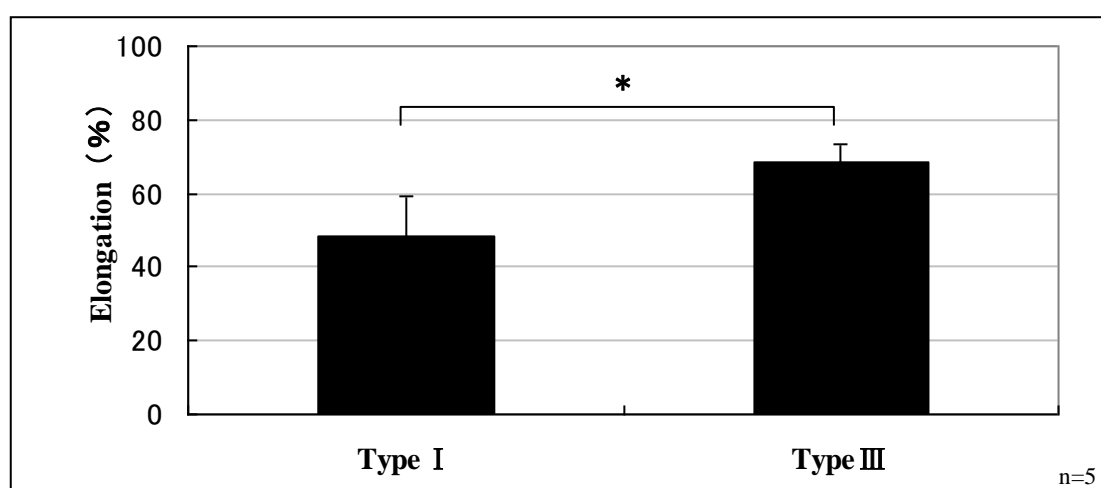


Fig3-12 各コラーゲンの伸長率

Fig3-11 より弾性率は I 型コラーゲンが $755 \pm 80.4 \text{kPa}$ 、III型コラーゲンが $351 \pm 98.5 \text{kPa}$ であった。よって圧縮試験(Fig3-8)と同様に I 型コラーゲンがIII型コラーゲンより高い弾性率を有することが確認された。また、Fig3-12より伸長率は I 型コラーゲンが $48.5 \pm 10.5\%$ 、III型コラーゲンが $68.3 \pm 5.2\%$ であった。よってIII型コラーゲンが I 型コラーゲンより高い伸長率を有することが確認された。

3-4 高強度コラーゲン材料の作製

3-4-1 線維配向コラーゲンの微細構造の観察

方法 2-9-1 で作製した I 型コラーゲンを用いて作製した線維配向コラーゲンの表面を SEM によって確認をした。

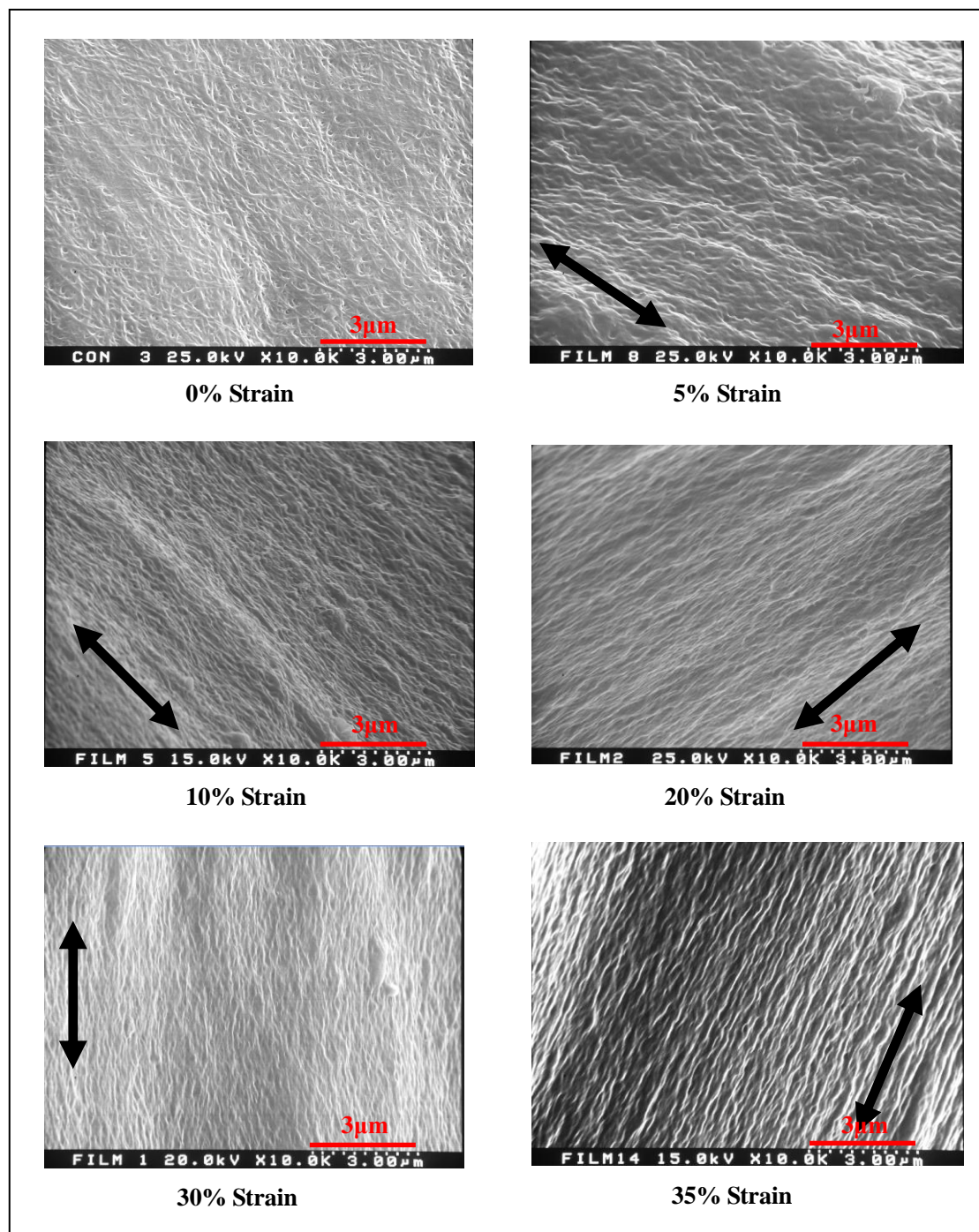


Fig3-13 線維配向コラーゲンの微細構造(表面)

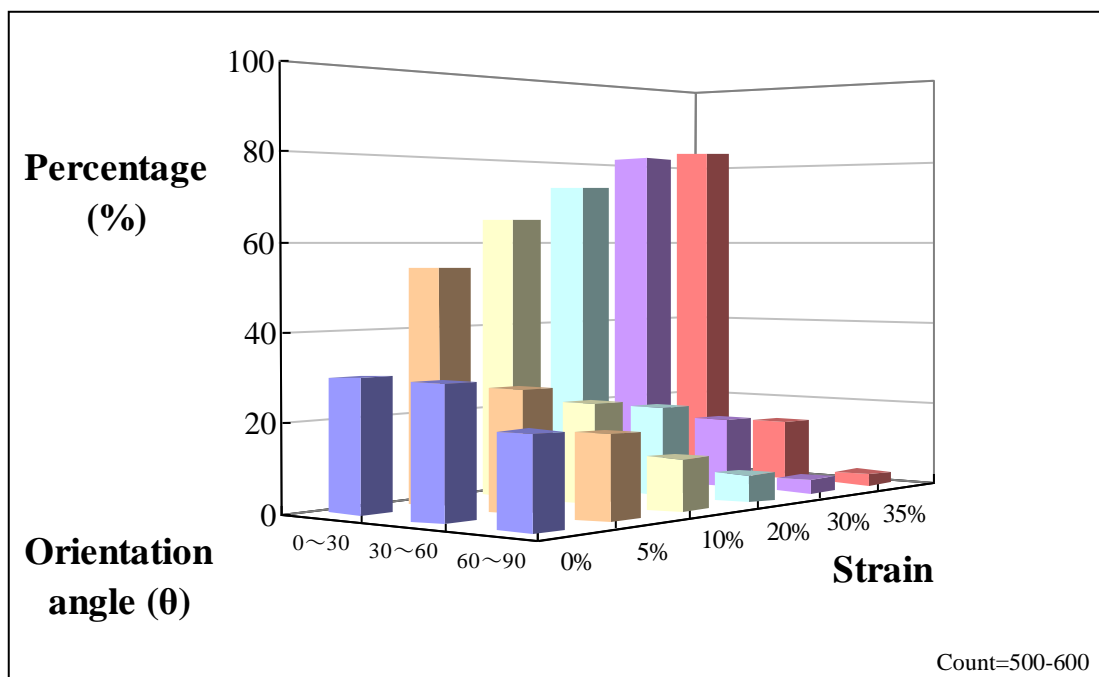


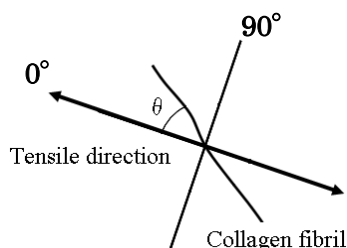
Fig3-14 引張り方向に対する配向角

Fig3-13 は各歪(0~35%)に対するコラーゲンフィルムの微細構造と矢印は引張り方向を示している。各コラーゲンフィルムは引張り方向に対しての線維配向を確認することができた。また、これらの観察はサンプル PBS 中に膨潤させ、凍結乾燥させたものである。そのため、膨潤後の線維配向した構造を維持することを確認することができた。

線維配向コラーゲンフィルムは乾燥後、引張り方向への伸びに応じてサンプルの中央部が垂直方向へ縮んでいることも目視によって確認された。これはポアソン比による変化であると考えられる。

Fig3-14 は引張り方向に対する配向角を測定し、各歪に対して配向度をプロットしたグラフである。歪を 0%から 35%へ増加させることによって配向度を増加させ、配向度は最大で 82.8%になった。

また、配向角の定義はサンプルの引張り方向を 0° とし、その方向からコラーゲン線維の傾きを測定した。配向角は $0^\circ \leq \theta \leq 90^\circ$ とした。



3-4-2 線維配向コラーゲンの膨潤率測定

I型コラーゲンを用いて作製した線維配向コラーゲンフィルムの重量膨潤率を測定し、ゲルとしての実質濃度を算出した。

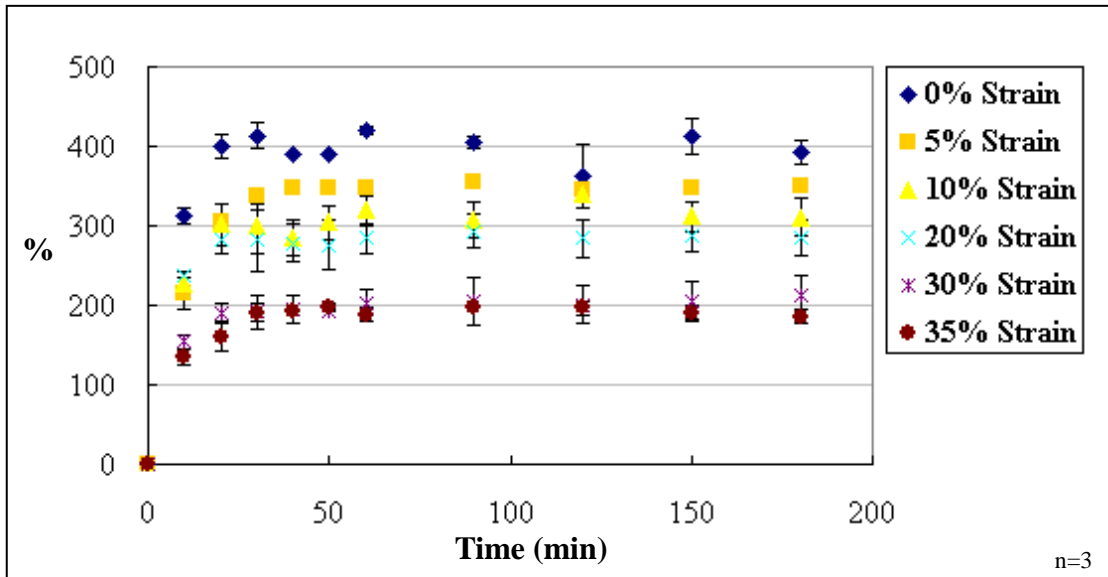


Fig3-15 線維配向コラーゲンフィルムの重量膨潤率

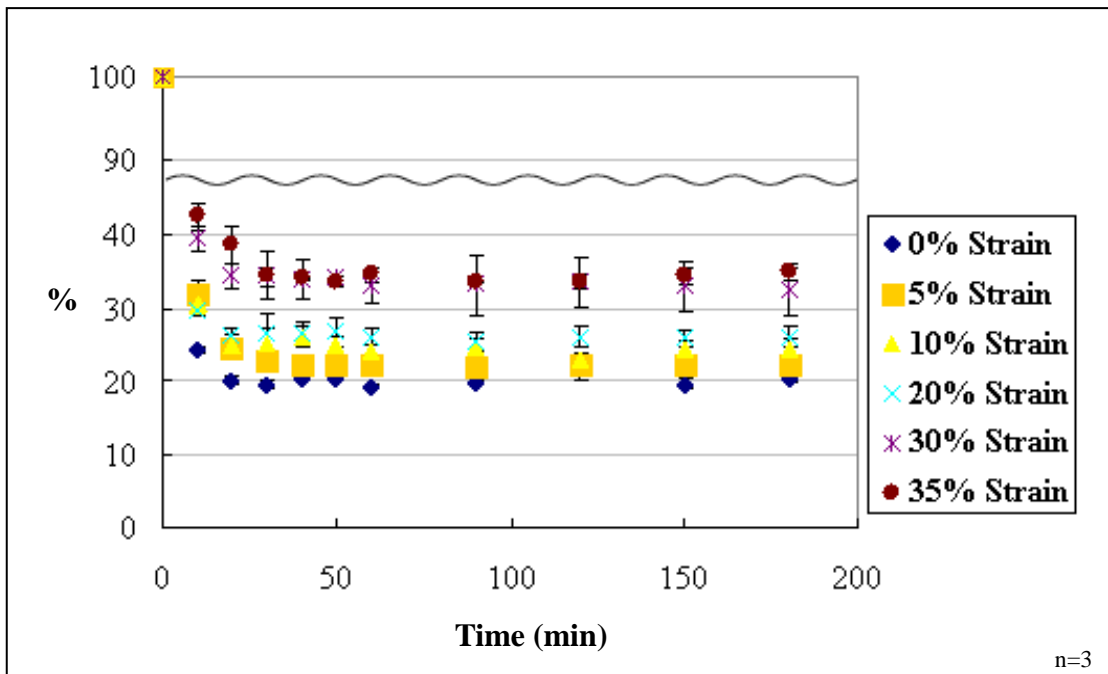


Fig3-16 線維配向コラーゲンフィルムの実質濃度

乾燥重量を 0min とし、フィルムを PBS 中に浸して時間ごとに重量を測定した。そこから重量膨潤率を算出した。Fig3-15 より各サンプルは約 30min ほどで膨潤率が一定になった。歪 0%は重量膨潤率が 398%、実質濃度が 20.1%ゲル、歪 5%は重量膨潤率が 347%、実質濃度が 22.4%ゲル、歪 10%は重量膨潤率が 309%、実質濃度が 24.5%ゲル、歪 20%は重量膨潤率が 284%、実質濃度が 26.1%ゲル、歪 30%は重量膨潤率が 200%、実質濃度が 33.3%ゲル、歪 35%は重量膨潤率が 190%、実質濃度が 34.5%ゲルとなった。歪を増加させることによって膨潤率を徐々に減少させ、実質濃度を徐々に増加させた。

3-4-3 線維配向コラーゲンの弾性率・伸長率測定(引張り試験)

I 型コラーゲンを用いて作製した線維配向コラーゲンフィルムの弾性率、伸長率を引張り試験により測定した。

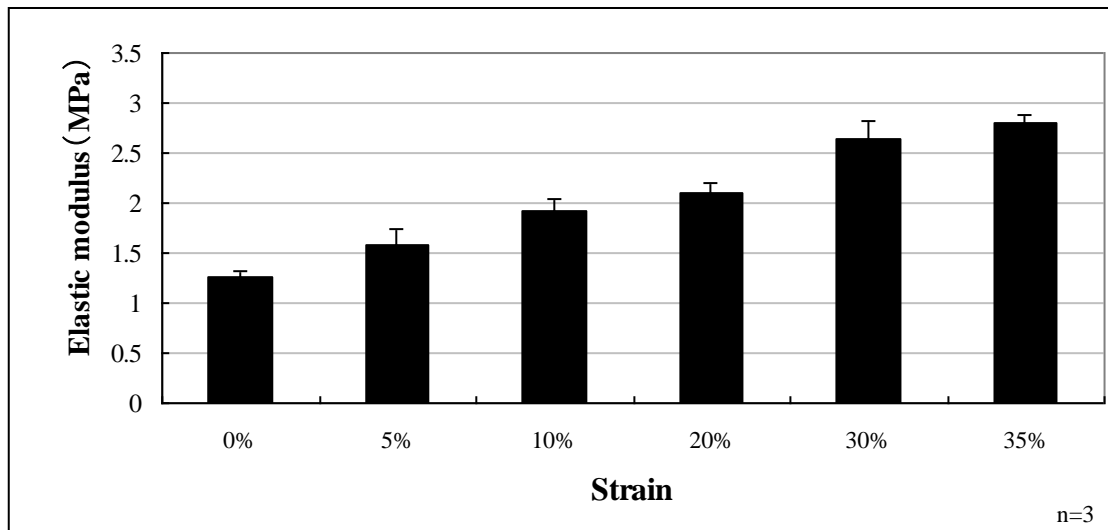


Fig3-17 線維配向コラーゲンフィルムの弾性率

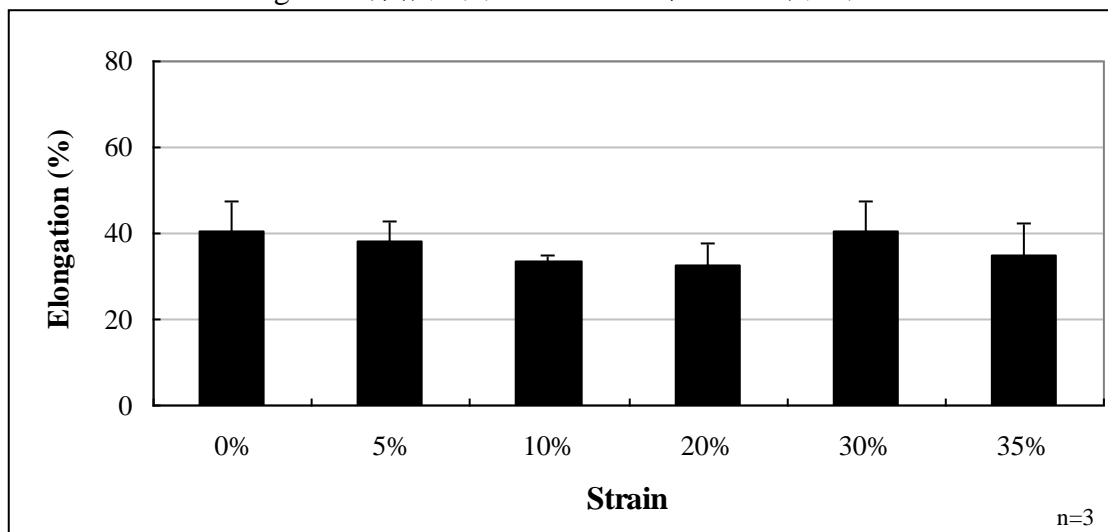


Fig3-18 線維配向コラーゲンフィルムの伸長率

Fig3-17より弾性率は歪0%が1.27MPa、歪5%が1.59MPa、歪10%が1.92MPa、歪20%が2.10MPa、歪30%が2.64MPa、歪35%が2.80MPaであった。歪を増加させることによって弾性率を増加させることができ、最大で2.8MPaまで到達することができた。Fig3-18より伸長率は0%Strainを除く各サンプルにおいて35%前後であり変化はなかった。

また、歪0%は方法2-4で作製したコラーゲンフィルムを再膨潤させたサンプルであり、Fig3-11と比較して弾性率・伸長率の変化が生じた。そのため、再度、再膨潤繰り返した際のコラーゲンフィルムの弾性率・伸長率を引張り試験により測定した。

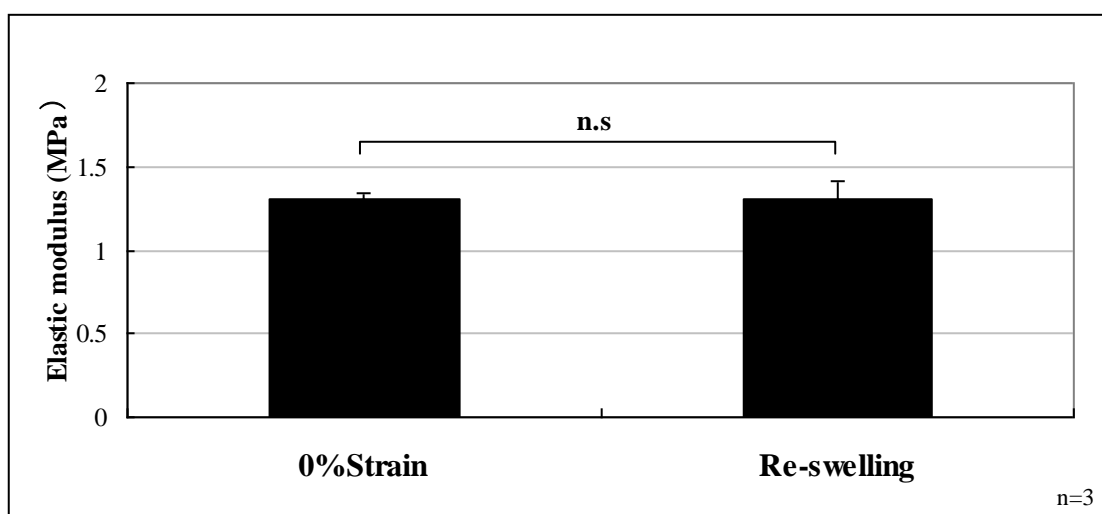


Fig3-19 再・再膨潤コラーゲンフィルムの弾性率

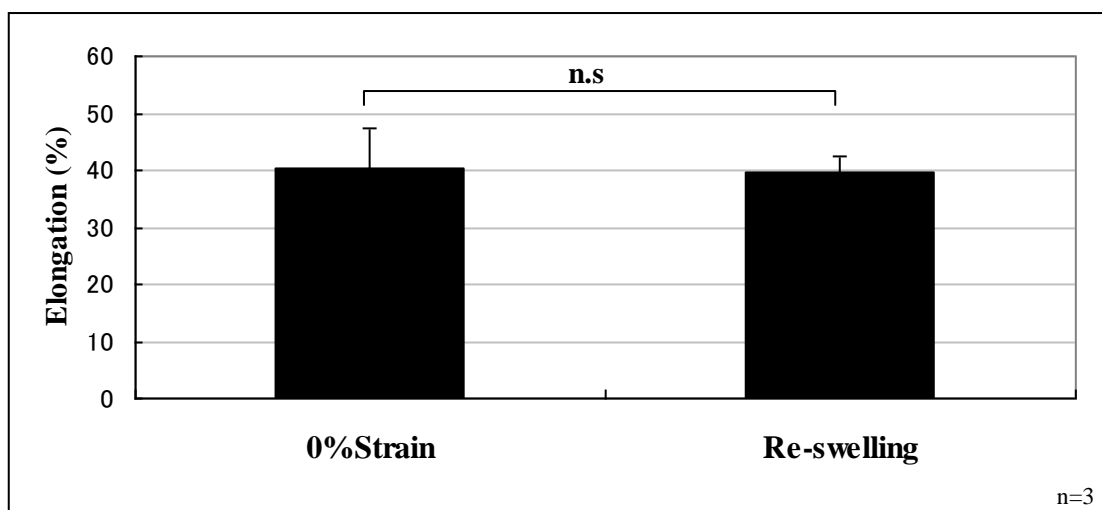


Fig3-20 再・再膨潤コラーゲンフィルムの伸長率

Fig3-19、Fig3-20より再度、再膨潤を繰り返したコラーゲンフィルムは弾性率・伸長率共に変化がなかった。そのため、再度、再膨潤は行わなくて良いと判断した。

3-4-4 架橋コラーゲンの膨潤率測定

I型コラーゲンを用いて線維配向コラーゲンフィルム(歪0%と歪35%)を作製後、EDC/NHSによる架橋を行なったサンプルの重量膨潤率を測定し、ゲルとしての実質濃度を算出した。

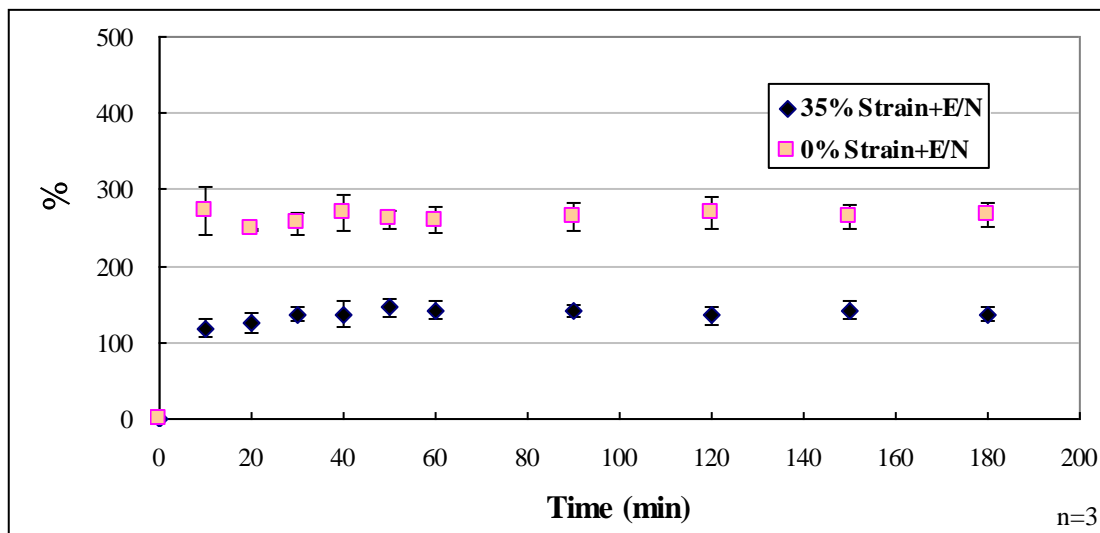


Fig3-21 架橋コラーゲンフィルムの重量膨潤率

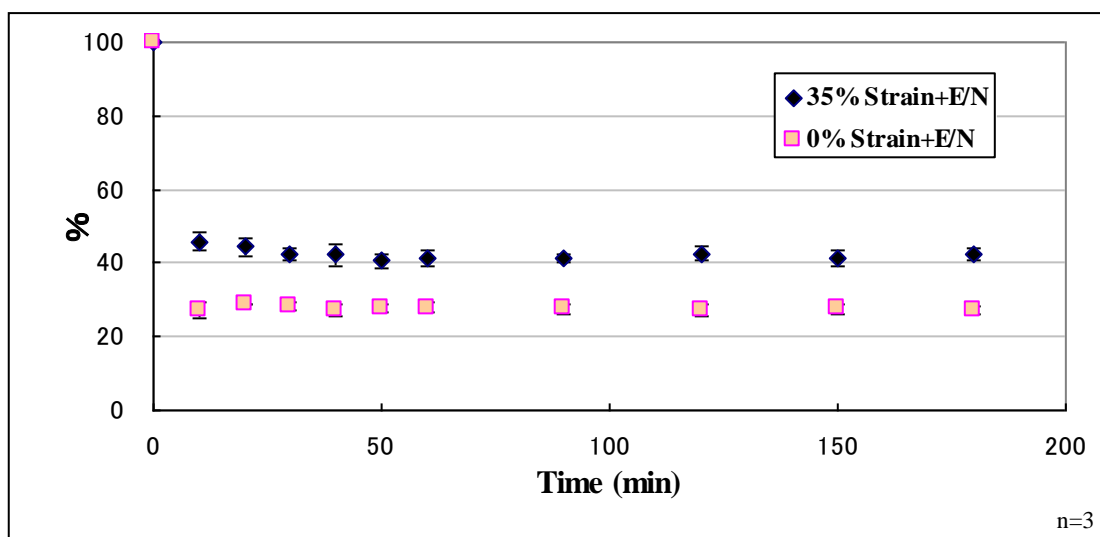


Fig3-22 架橋コラーゲンフィルムの実質濃度

乾燥重量を0minとし、フィルムをPBS中に浸して時間ごとに重量を測定した。そこから重量膨潤率を算出した。Fig3-19よりどちらのサンプルも約10minほどで膨潤率が一定になった。これはFig3-15と比較してEDC/NHS架橋の影響によって短縮された。Fig3-21、Fig3-22より歪0%+EDC/NHS架橋は重量膨潤率が262%。実質濃度が27.6%ゲル、歪35%+EDC/NHSは重量膨潤率が138%、実質濃度が42.0%

ゲルとなった。結果 3-4-2 と比較して歪 0%と歪 35%との重量膨潤率および実質濃度の値の差を維持したまま、EDC/NHS 架橋の影響により重量膨潤率および実質濃度の増加が確認された。

3-4-5 架橋コラーゲンの弾性率・伸長率測定(引張り試験)

I 型コラーゲンを用いて線維配向コラーゲンフィルムを作製後、EDC/NHS による架橋を行なったサンプルの弾性率、伸長率を引張り試験により測定した。

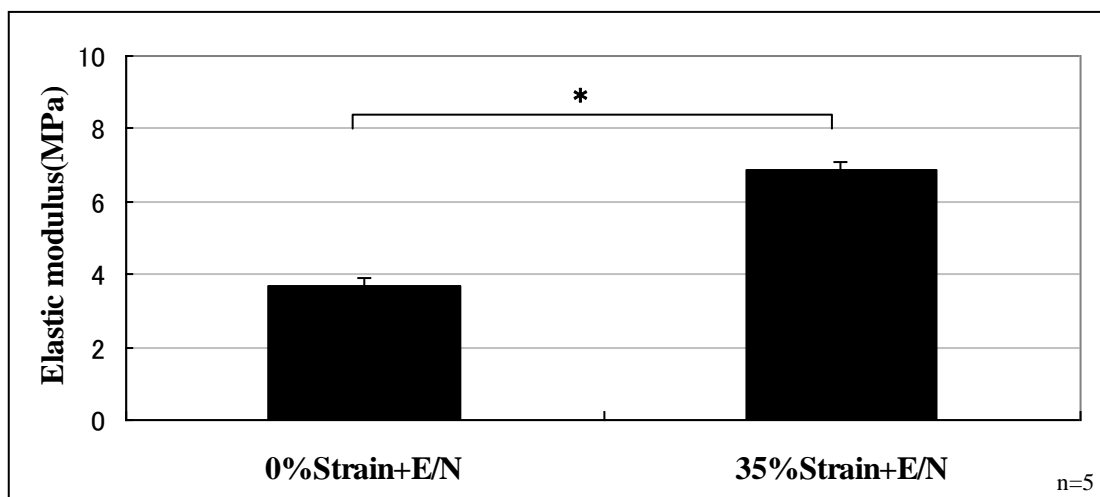


Fig3-23 架橋コラーゲンフィルムの弾性率

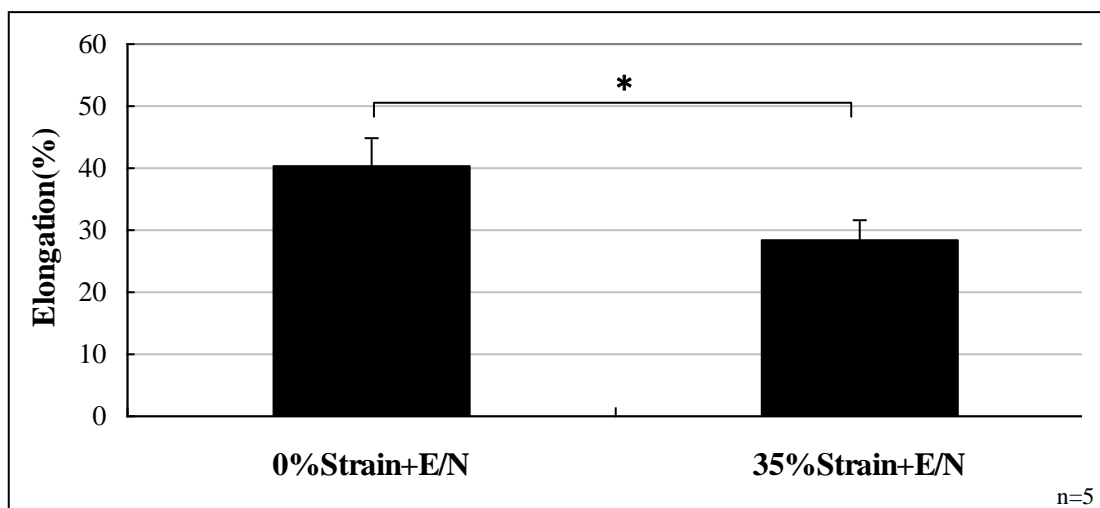


Fig3-24 架橋コラーゲンフィルムの伸長率

Fig3-23、Fig3-24 より歪 0%+EDC/NHS 架橋は弾性率が 3.70MPa で伸長率が 40.5%であり、歪 35%+EDC/NHS 架橋は弾性率が 6.86MPa で伸長率が 28.5%であった。Fig3-17 で得られた弾性率の差を維持したまま、EDC/NHS 架橋により弾性率の増加が確認された。また、Fig3-18 と比較して伸長率は大きな変化は見られないが、わずかに減少が確認された。

3-4-6 III型コラーゲン複合化材料の微細構造の観察

結果 3-4-5 より、線維配向コラーゲンフィルムを作製後、EDC/NHS 架橋を行なったサンプルは最大で 6.86MPa と大きな弾性率の増加が確認されたが、伸長率が 28.5%と減少してしまった。結果 3-3-4 ではIII型コラーゲンは伸長率へ影響があることが確認されているため、本項目ではIII型コラーゲンをを用いて伸長率の増加を試みた。I 型コラーゲンをを用いて線維配向コラーゲンフィルムを作製後、中和したIII型コラーゲンを染み込ませてコーティングさせたサンプルの表面を SEM によって観察した。

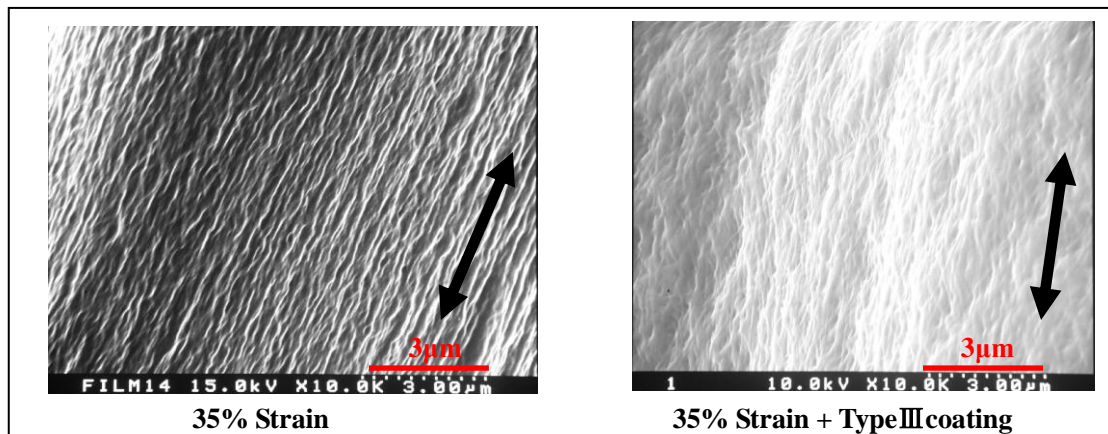


Fig3-25 III型コラーゲン複合化材料の微細構造

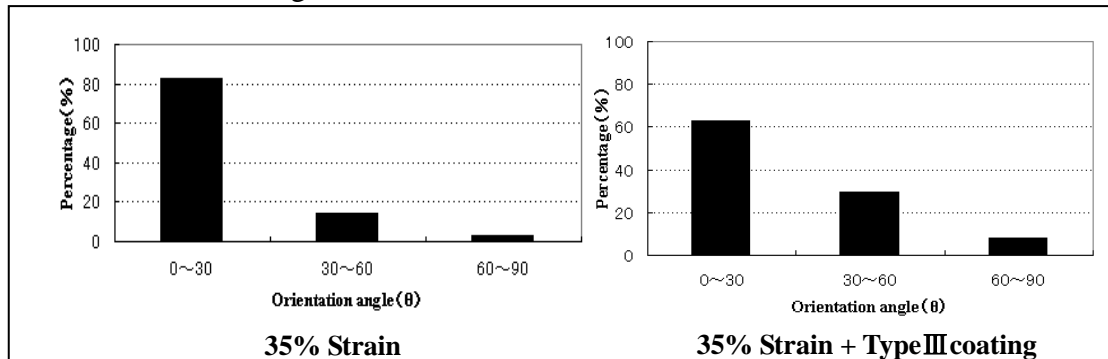


Fig3-26 引張り方向に対する配向角

Fig3-25 はIII型コラーゲン複合化材料の微細構造であり、矢印は引張り方向を示している。左側はIII型コラーゲンコーティング前の線維配向コラーゲン(歪 35%、Fig3-13 と同様)を示し、右側は線維配向コラーゲンにIII型コラーゲンコーティング後のサンプルを示している。

Fig3-26 は引張り方向に対する配向角を測定したグラフである(歪 35%は Fig3-14 と同値)。歪 35%では 0~30 の配向度が 82.8%であったが、III型コラーゲンをコーティングすることによって 0~30 の配向度は 62.7%へ減少し、30~60 および 60~90 の角度の割合の増加が確認された。これらのことから、III型コラーゲンのコーティングを確認した。

3-4-7 III型コラーゲン複合化材料の弾性率・伸長率測定(引張り試験)

線維配向コラーゲンフィルムに、中和したIII型コラーゲンを染み込ませてコーティングさせ、EDC/NHS 架橋を行った後、引張り試験を行なった。

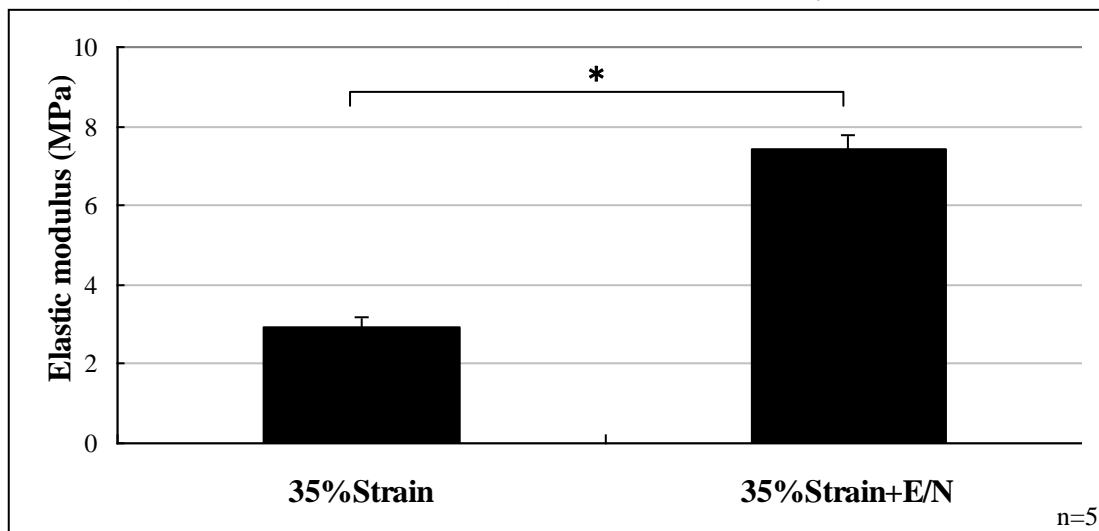


Fig3-27 III型コラーゲン複合化材料の弾性率

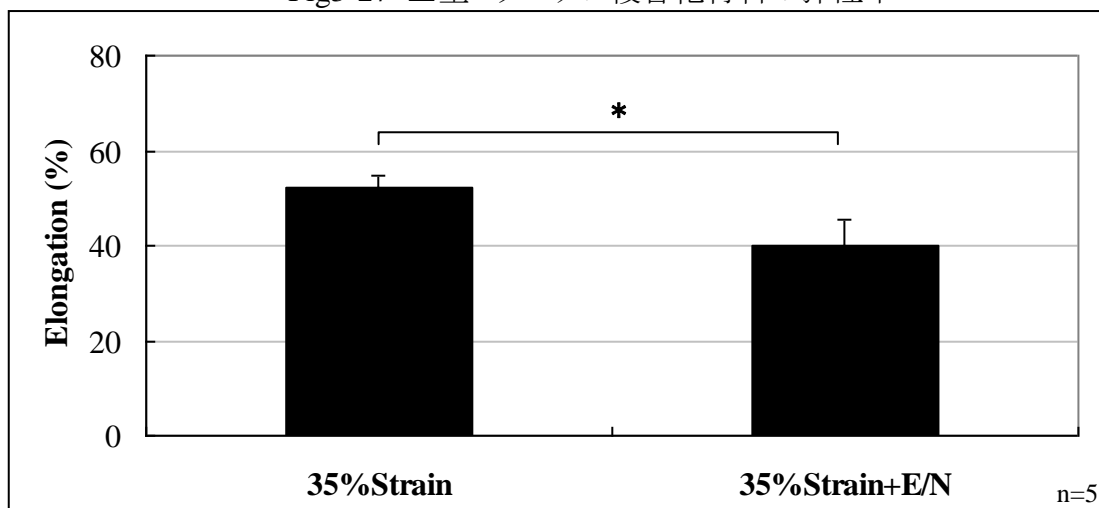


Fig3-28 III型コラーゲン複合化材料の伸長率

Fig3-27とFig3-28は結果3-4-3のFig3-17、Fig3-18と比較して弾性率が2.80MPa、伸長率が33.7%であった。35%の線維配向コラーゲンはIII型コラーゲンの複合化により弾性率は2.95MPaとあまり変化はないが、伸長率が52.2%へと増加が確認された。また、結果3-4-5のFig3-23、Fig3-25と比較して弾性率が6.86MPa、伸長率が28.5%であった。35%の線維配向にEDC/NHS架橋を行なったコラーゲンは弾性率が7.43MPa、伸長率が40.2%となりどちらの増加も確認された。再膨潤による線維配向およびEDC/NHS架橋によって減少した伸長率がIII型コラーゲンの複合化によって増加させることができた。また、EDC/NHS架橋を施したコラーゲンは弾性率を増加させることができた。

3-4-8 フィルム状コラーゲンの弾性率変化(まとめ)

各条件によって作製したコラーゲンの弾性率の変化を Fig3-29 にまとめた。

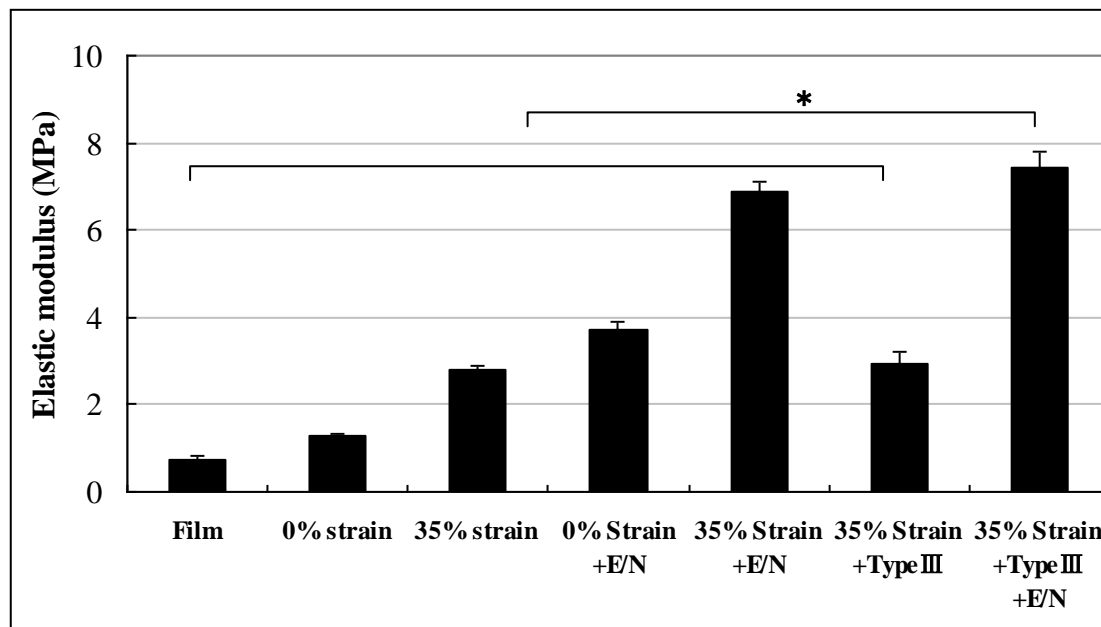


Fig3-29 フィルム状コラーゲンの弾性率変化

ゲルをフィルム状に乾燥させたサンプルから再膨潤を行うことで線維の収縮が起こり、弾性率は755kPaから1.27MPaへ増加した(Filmから0%Strain)。また、再膨潤の際に、歪を加えたまま乾燥させることにより線維を配向させることで弾性率は最大で2.80MPaまで増加した(35%Strain)。次に線維配向コラーゲンにEDC/NHS架橋を組み合わせることにより弾性率は6.86MPaまで増加した(35%Strain+E/N)。最後に線維配向コラーゲンにⅢ型コラーゲンを複合化させた後にEDC/NHS架橋を行うことで弾性率は7.43MPaまで増加した。また、その際の伸長率は40.2%であった(35%Strain+TypeIII+E/N)。

以上、線維配向、架橋、Ⅲ型コラーゲンの複合化により、弾性率が最大で7.43MPaのコラーゲン材料の作製に成功した。

4章 考察

コラーゲンの Type 別分画

Table3-1 の血管外膜からのコラーゲンの収率より各 NaCl 濃度の範囲にそれぞれコラーゲンの沈殿が確認された。NaCl の添加によりコラーゲンが沈殿する理由としてはコラーゲン溶液中の NaCl 濃度が大きくなった時、加えられたナトリウムイオン、塩化物イオンがコラーゲン分子と溶媒である水分子を奪い合う。この結果、コラーゲン同士の相互作用が溶媒同士の相互作用より強くなり、疎水性の相互作用によって凝集し沈殿すると考えられる。

また、NaCl 濃度依存によりコラーゲンを Type 別に分画できる理由としては、NaCl 濃度や pH に対しての溶解度の違いが挙げられる。これは各 Type 別コラーゲンの親水性、疎水性のアミノ酸組成比や等電点の違い等といった数種類の要因によるものである。また、Ⅲ型コラーゲンは I 型コラーゲンと比較して NaCl 濃度が低い条件でも沈殿が生じやすく、溶解度が低い。この要因としてⅢ型コラーゲンはジスルフィド結合などの分子間架橋を形成していることが 1 つの要因として考えられる。

コラーゲンの同定

I型とIII型コラーゲンの分画を確認するために SDS-PAGE と Western blotting 法を用いて同定を行なった。

コラーゲンの 3 重螺旋構造はメルカプトエタノールを含む溶液により、ジスルフィド結合が切断され、煮沸処理によって 1 本鎖へほどけ、分子量はどちらも 100k~120kDa である。そのため、分子量による比較はできないが、バンドの数および発光強度に大きな違いが得られた。

Fig3-1 の各コラーゲンの分画からは 100k~120kDa 付近に検出された I 型コラーゲンが太いバンドと細いバンドの 2 本のバンド、III型コラーゲンが太いバンドが 1 本検出された。そのため、どちらのコラーゲンも純度良く精製できたと判断した。

また、V型コラーゲンとして精製したサンプルは 140k~180kDa 付近に V 型コラーゲン特有のバンドを示した。しかし、100k~120kDa 付近にも他のバンド (I 型コラーゲン) も同時に確認されている。これは I 型コラーゲンと III 型コラーゲンとして精製したサンプルからは V 型コラーゲンを取り除くことができたが、V 型コラーゲンとして精製したサンプル単独では純度が良くなかったと考えられる。今後、V 型コラーゲンのみで純度を上げるためには、胎盤などの V 型コラーゲンをより多く含む組織からの抽出が望ましいと考えられる。

V 型コラーゲンはコラーゲン線維径の調節を担っており、V 型コラーゲンが多くなることで線維が細くなる。また、血管内皮細胞の増殖を調節する機能がある一方、動脈硬化の可能性が高くなったり、張力がなく不完全なコラーゲン線維であるといった報告もある¹²⁾。また、材料化のためには機械的特性などの研究が発展しておらず、不明な点が多い。今後、より純度の高い V 型コラーゲンの精製が可能となれば、V 型コラーゲンを必要とする組織に対して、さらに機能と組成を近づけた足場材料が作製可能になる。

Western blotting 法は I 型コラーゲンと III 型コラーゲンの純度比較と同定を行うために行なった。Fig3-2、Fig3-3、Fig3-4 から I 型コラーゲンとして精製したサンプルには III 型コラーゲンを含まないこと、また III 型コラーゲンとして精製したサンプルには I 型コラーゲンを含まないことが確認できた。そのため、他の種類のコラーゲンを含まない、純度が高いものが精製できたと判断した。

Type 別コラーゲンの力学的特性と微細構造

Fig3-6 と Fig3-7 より SEM により微細構造の観察結果、コラーゲンの線維径は I 型コラーゲンが太く、III 型コラーゲンが細い線維であることが確認された。また、Fig3-8 と Fig3-11 より圧縮弾性率・引張り弾性率は共に I 型コラーゲンが高いことが確認された。これらは線維径が弾性率に影響を与えたと考えられる。

圧縮試験への影響

Fig3-8 のコラーゲンゲルの圧縮弾性率の影響を構造から考察する場合は、線維径の他にゲル濃度と空隙率に関わってくる。しかし、ゲル濃度はどちらも 3.2mg/ml で同じである。また、ゲル濃度 4.0mg/ml に関しての空隙率はどちらも約 30% であり、ほぼ同じである報告がある¹⁴⁾。つまり、考えられる要因が線維径の影響のみとなり、それが圧縮に対しての拮抗力を生み出したと考えられる。そのため、線維径が大きい I 型コラーゲンが高い弾性率、線維径が小さい III 型コラーゲンが低い弾性率を示したと考えられる。

本実験では血管外膜作製に焦点を当てている。そのため、材料の圧縮試験の影響を考慮する必要性はないが、Type 別のコラーゲンの物性値の違いを評価するために行なった。また、GAG の添加によりコラーゲンの線維径や空隙率を変化させることができると報告されている¹⁴⁾。ここで得られた知見は組織充填材料や軟骨、骨などのバイオマテリアルとして応用可能であると考えられる。

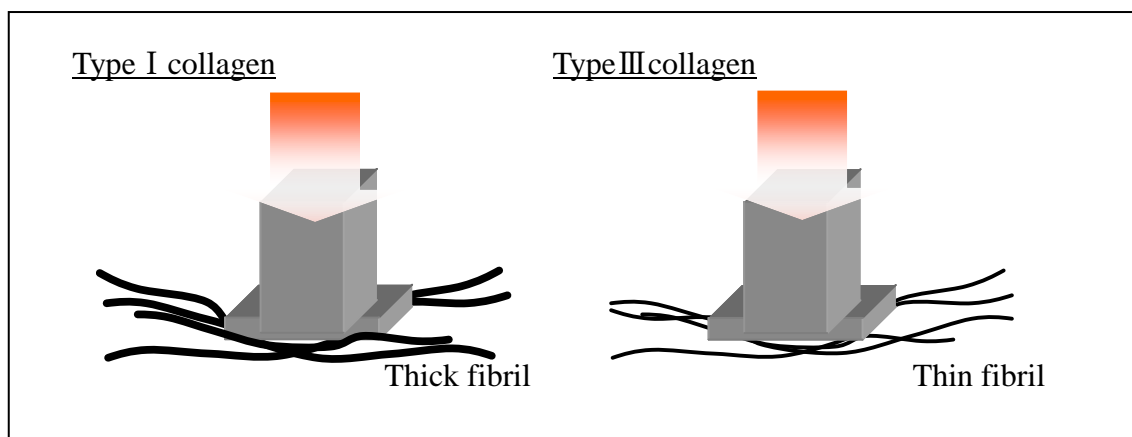


Fig4-1 圧縮に対する線維径の影響

引張り試験への影響

コラーゲンフィルムはゲルを乾燥させて作製したものである。線維が収縮し、緻密な構造になったため、膨潤を抑えることができ、強度に繋げることができると考えられるために用いた。

Fig3-11 のコラーゲンフィルムの引張り試験は 37°C の PBS 中にて行なった。引張り弾性率の影響を考察する場合は、線維径の他にゲルの実質濃度が関わってくる。そのため、あらかじめコラーゲンフィルムの膨潤率が一定になる時間を測定し、ゲルとしての実質濃度を算出した。しかし、Fig3-9、Fig3-10 よりフィルムの膨潤率が一定になった時のゲルとしての実質濃度は I 型コラーゲンが約 16.4%ゲル、III 型コラーゲンが約 15.7%ゲルとほぼ同じであった。そのため、ゲルの実質濃度に対する影響ではなく、線維径が最も影響した要因であると考えられる。フィルム状の材料はゲルを乾燥させただけであるため、ゲルと同様の線維径を示すと推測される。そのため、太い線維ほど高強度へと繋がり、線維径が大きい I 型コラーゲンが高い弾性率、線維径が小さい III 型コラーゲンが低い弾性率を示したと考えられる。

反対に、Fig3-12 より III 型コラーゲンが I 型コラーゲンより高い伸長率を有することが確認された。ゲルとしての実質濃度がほぼ同じであるにも関わらず、線維径は I 型コラーゲンが大きくなったことから、線維量は III 型コラーゲンが多いと推測される。また、実際に I 型コラーゲンよりも III 型コラーゲンの方が線維化しやすいという報告もある¹⁴⁾。線維の緩みが大きくなったため、応力によって破断されにくい構造になったと考えられる。そのため、線維量が多い III 型コラーゲンの方が I 型コラーゲンより高い伸長率を示したと考えられる。

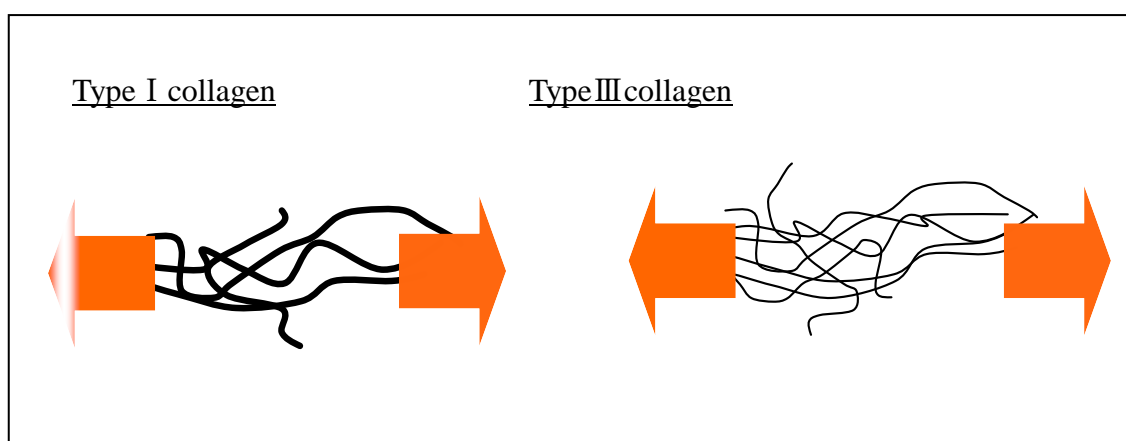


Fig4-2 引張りに対する線維の影響

Ⅲ型コラーゲンは骨には全く存在しないが、血管等の弾性を有する組織に含まれる。このことから生体内におけるコラーゲンはⅠ型コラーゲンが主に強度を担い、Ⅲ型コラーゲンが主に伸縮性を担う材料であることが示唆された。また、Ⅲ型コラーゲンはⅠ型コラーゲンと比較して、細胞の接着・増殖を容易する構造であるため、組織の再生を促す材料を作製するためには欠かせない。そのため、強度や柔軟性、細胞の応答性を持たせた材料を作製するためにはどちらのコラーゲンも必要であると考えられる。

本実験において、Ⅰ型コラーゲンをを用いて強度を増加させ、Ⅲ型コラーゲンをを用いて柔軟性の向上を目指し、複合化した材料の作製を試みた。

Type 別コラーゲンの微細構造

Fig3-6 と Fig3-7 より SEM により微細構造の観察結果、コラーゲンの線維径は I 型コラーゲンが太く、III型コラーゲンが細い線維であることが確認された。このような差が生じた要因としてコラーゲンゲルは温度上昇によってゲル化することからアミノ酸の疎水性相互作用が大きく関わっていると考えられる。

そのため各タイプ別コラーゲンのアミノ酸組成から 1 分子あたりの疎水性アミノ酸の割合と疎水度を示すパラメータである疎水性インデックスの加算値を求めた。Table4-1 では各々のコラーゲンのアミノ酸の分子量、疎水性インデックス値、組成を示し、算出するための計算に用いた³⁴⁾³⁵⁾。Table4-2 では疎水性アミノ酸の割合と疎水性インデックスの加算値の算出結果を示した。また、Hyp は Pro、Hyl は Lys の値を用いた。

Table4-1 コラーゲンのアミノ酸組成と疎水性インデックス値

Amino acid	Molecular weight	Hydropathy index	$\alpha 1$ (I)	$\alpha 2$ (I)	$\alpha 1$ (III)
Gly	75.1	-0.4	352	350	360
Pro	115.1	-1.6	139	123	96
Hyp	131.1	-1.6	102	87	146
Ala	89.1	1.8	121	113	90
Cys	121.2	2.5	0	0	1
Asp	133.1	-3.5	30	24	26
Glu	147.1	-3.5	44	46	48
Phe	165.2	2.8	13	12	8
His	155.2	-3.2	2	11	6
Ile	131.2	4.5	7	15	14
Lys	146.2	-3.9	31	23	31
Leu	131.2	3.8	21	33	19
Met	149.2	1.9	7	5	9
Asn	132.1	-3.5	13	22	22
Gln	146.2	-3.5	30	23	27
Arg	174.2	-4.5	51	53	48
Ser	105.1	-0.8	39	36	39
Thr	181.2	-0.7	17	19	14
Val	117.1	4.2	21	34	11
Trp	204	-0.9	0	0	0
Tyr	181.2	-1.3	2	4	2
Hyl	162.2	-3.9	5	9	6

Table4-2 コラーゲンの疎水性アミノ酸の割合と疎水性インデックスの加算値

	Type I collagen	Type III collagen
Hydrophobic amino acid (%)	69.7	64.3
Hydropathy index	-2524.0	-2998.2

Table4-2 より疎水性アミノ酸の割合は I 型コラーゲンが III 型コラーゲンより多い。また、疎水性インデックスの加算値の絶対値は負になっているが、相対的に比較すると I 型コラーゲンが III 型コラーゲンより大きい。

これら 2 つの要素が疎水性相互作用による分子の凝集のしやすさ、また分子間の疎水性結合範囲による分子間のずれに大きく関わっていると考えられる。

よって I 型コラーゲンは分子が多く凝集し、分子間のずれが小さく結合することによって線維径が大きくなり、III 型コラーゲンは分子が凝集しにくく、分子間のずれが大きく結合することにより線維径が小さくなると考えられる。



Fig4-3 分子の凝集のしやすさ、分子間のずれイメージ図

線維配向コラーゲンの構造

Fig3-13 よりコラーゲンフィルムを PBS にて膨潤させ、歪を加えたまま固定化し、乾燥させ、再度膨潤後、凍結乾燥を行なったサンプルを SEM で観察した結果、コラーゲンの線維配向が観察された。また、Fig3-14 より歪を 0%から 35%へ増加させることによってコラーゲン線維の配向度を増加させることができた。この方法によって作製したサンプルは膨潤後の線維配向した構造を維持することが確認された。

これはコラーゲン線維による力によってこの構造が維持されたと推測される。これらのサンプルは歪を加えることによる構造変化であるため、コラーゲンの 3 重螺旋構造の分子レベルにおける結合や伸長などの変化は何もないと考えられる。サンプル作製の開始はコラーゲンゲルの作製からであり、コラーゲンゲルの濃度は溶解度の関係から 0.8%に設定をした。この方法によって作製されたコラーゲンゲルの線維は Fig3-6 からも確認できるように、ランダムにできる。このコラーゲン線維にはコラーゲン分子間による疎水性相互作用が大きく関わっているが、コラーゲン線維間同士にも同様の結合が行われると考えられる。つまり、ランダムなコラーゲン線維間においても一部は結合している状態であり、Fig3-13 の 0%Strain が示すように、線維を濃縮させたフィルムも同じような状態であると推測される。この状態のまま歪を加えることによって結合に関与せず、あらゆる方向に向いた自由度の高い線維が引張り方向へ伸長され、配向すると考えられる。そして、その際、線維間同士の距離が短くなり、接している面積も大きくなるため、結合力が大きくなり、配向した構造を維持することに繋がったと考えられる。また、コラーゲン線維自身に伸縮性を持たないことも構造を維持した 1 つの要因として挙げられる。

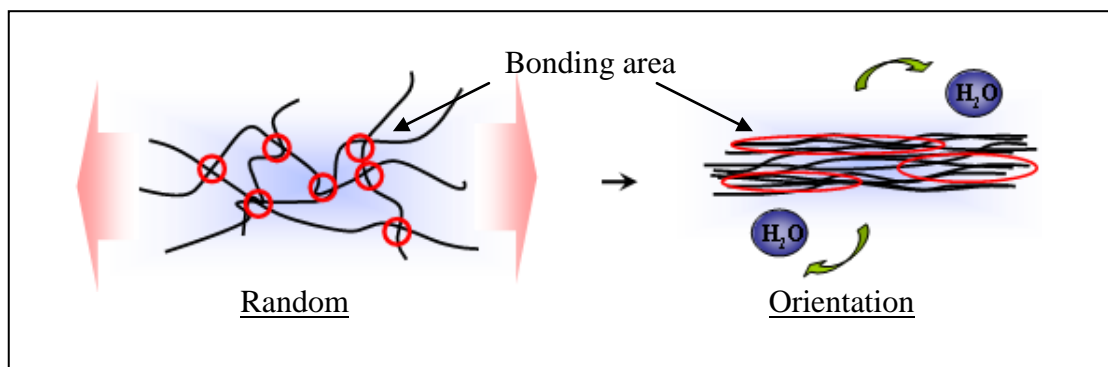


Fig4-4 歪による線維配向および構造維持

それ以外の要因としては、乾燥した線維配向コラーゲンフィルムが作製された際に、サンプル自身に残された結合水が関与するものである。本来ハイドロゲル中の水分には、不凍水、拘束水、自由水の 3 種類がある。不凍水とは水素結合などで網目に結合した水、拘束水は不凍水の周囲に拘束されている水、自由水とはバルクの水と同等の性質を持つ水のことである。この 3 種類の中で結合に関与するものが不凍水と拘束水である。

ランダムな網目状のゲルから線維濃縮によるフィルム化を行い、その後の線維配向化に連れて、自由水の割合が小さくなり、結合水の割合が大きくなる。また、線維間が小さくなっているため、結合水が排除されにくい。そのため、多くの結合水が線維間へ閉じ込められたままの状態になり、残存する。その結果、ヒドロキシプロリンやヒドロキシリシンなどのアミノ酸によって結合水を介した水素結合がより強固なものとなり配向した構造を維持したと考えられる。

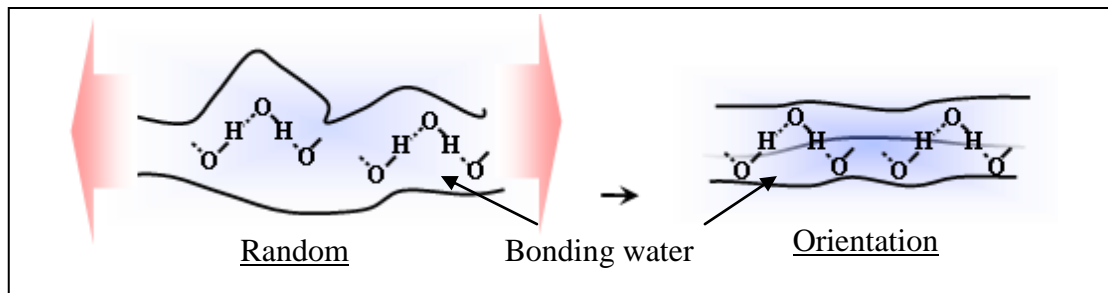


Fig4-5 結合水を介した水素結合による構造維持

また、歪の増加か配向度を増加させたことについては、歪の増加によってあらゆる方向に向いた自由度の高い線維が引張り方向へ対して向きを変えるのに直接影響があったと考えられる。

線維配向コラーゲンの実質濃度、配向度、弾性率の関係

結果 3-4 より、本研究では線維配向コラーゲンを作製し膨潤率からのゲルとしての実質濃度の算出、SEM による微細構造観察、引張り弾性率の 3 点から評価を行った。Fig4-5 は配向度に対する実質濃度をプロットしたグラフ、Fig4-6 は実質濃度に対する弾性率をプロットしたグラフであり、Fig4-7 は配向度に対する弾性率をプロットしたグラフである。

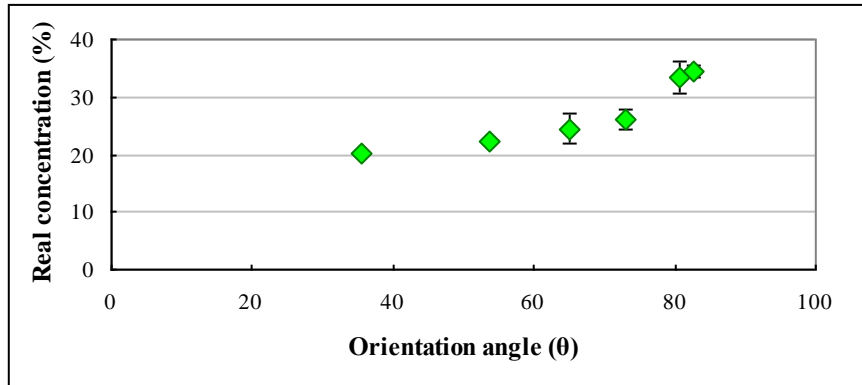


Fig4-5 線維配向コラーゲンの配向度に対する実質濃度

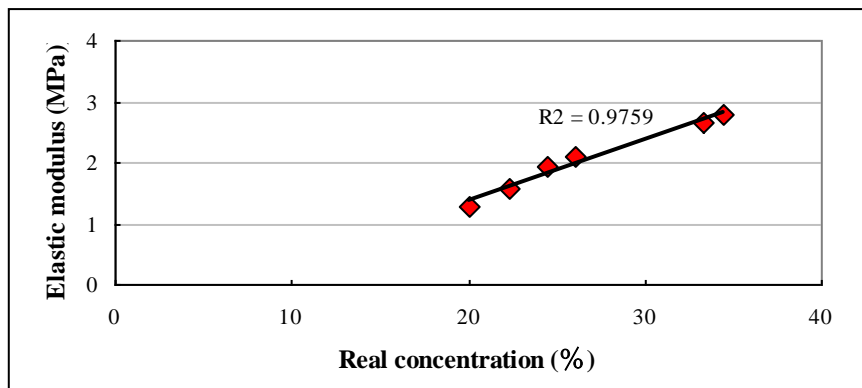


Fig4-6 線維配向コラーゲンの実質濃度に対する弾性率

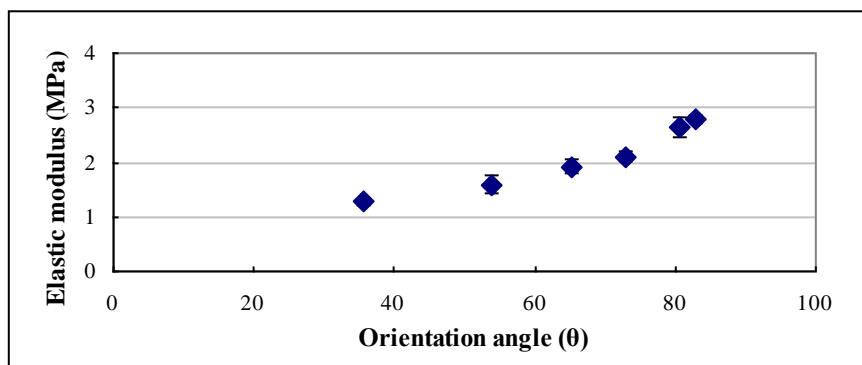


Fig4-7 線維配向コラーゲンの配向度に対する弾性率

Fig4-5 より、配向度の増加が実質濃度を増加させる傾向があると確認された。これは考察の「線維配向コラーゲンの構造」と重複する部分があるが、線維が配向することによって、線維間同士の距離が小さくなり、より緻密な構造となる。そのために水の侵入を妨げることとなり、実質濃度の増加へ繋がったと考えられる。

Fig4-6 より線形的な関係となり、コラーゲンのゲルとしての実質濃度が直接弾性率へ依存すること確認された。また、Fig4-7 より配向度の増加が弾性率を増加させる傾向があることが確認された。これらの結果から、配向度を限りなく 100 に近づけた場合、ゲルとしての実質濃度が約 40%、弾性率が約 3.5MPa まで作製可能であると考えられる。

また、Fig3-14 より線維配向コラーゲンを作製する際、歪を大きくすることが配向度の増加へ繋がった。つまり、更に配向度を増加させることができる作製方法があれば、更なる弾性率の増加へ繋がれるということになる。方法 2-9-1 より線維配向コラーゲンを作製する際の条件として引張り速度を 0.5mm/s にて行なった。これはこの引張り速度で行なった Fig3-12 の I 型コラーゲンフィルムの伸長率が $48.5 \pm 10.5\%$ であったため、歪を 35% 以上にするとサンプルが途中で破断してしまう恐れがあった。そのため、歪は 0%~35% の範囲内で行なった。しかし、引張り速度を 0.5mm/s より小さくすることにより歪を更に大きくできる可能性があると考えられる。なぜなら、ゲル構造は個体と流体の 2 相を有するため、系全体が一定の材料ではない。そのため、ゆっくり引張り歪を加えることによって、ゲル内の緩和が起き、破断することなくより伸長できる可能性があると考えられるためである。それらのことにより、配向度を増加させることができる可能性があると考えられる。

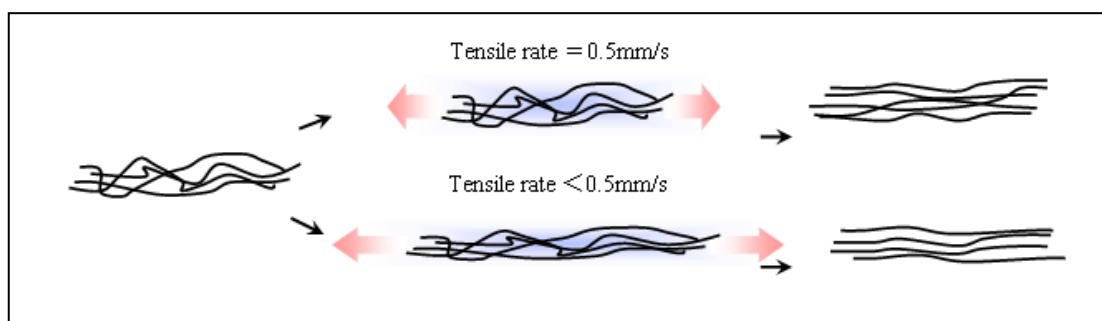


Fig4-7 引張り速度による配向度の増加

架橋コラーゲンの実質濃度、弾性率の関係

線維配向コラーゲンの弾性率は最大で 2.80MPa であった。線維配向によって弾性率の増加は得られたが、目標値である 10MPa には届かなかった。更なる弾性率の増加を目指すために、架橋剤の影響を調査した。架橋剤の選択としては機械的強度の増加と共に、細胞毒性を示さないことが重要である。現在の一般的な架橋剤としては EDC と NHS を用いた方法が用いられている。この架橋剤はコラーゲンの分子内、分子間の脱水縮合を誘発する。低い機械的強度ではあるが、副生成物である尿素が洗浄で除去しやすい点や未反応架橋部位が残存しにくい点から用いられ易い。また、架橋倍率はコラーゲンのカルボキシル基のモル比に対して EDC:NHS:COOH=5:5:1 で行なった。この架橋倍率は引張り強度の増加、アミノ基の定量による架橋度の増加から最も良いと報告されている²⁴⁾。そのために以上の架橋剤および架橋条件を選択した。

結果 3-4-4 の Fig3-21、Fig3-22 より EDC/NHS 架橋を行なったサンプルは架橋を行っていないサンプルである結果 3-4-2 の Fig3-15、Fig3-16 と比較して、重量膨潤率の減少とゲルとしての実質濃度の増加が確認された。これは EDC/NHS 架橋の影響によるものであり、分子内、分子間、線維間が架橋されたことによって、線維間同士の距離が更に小さくなったと考えられる。そのため、更に緻密な構造となり、水の侵入を妨げることとなり、実質濃度の増加へ繋がったと考えられる。

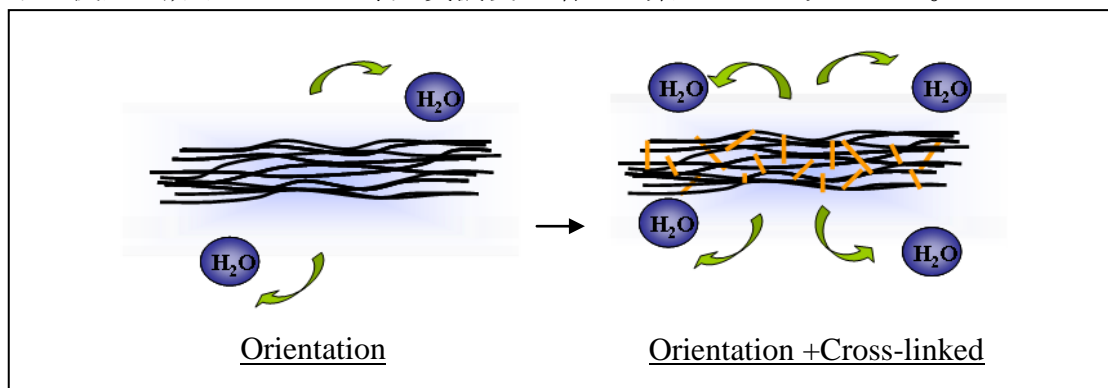


Fig4-8 架橋による実質濃度の増加

また、3-4-5 の Fig3-23 より EDC/NHS 架橋を行なったサンプルは結果 3-4-3 の Fig3-17 と比較して、弾性率の増加が確認された。これは重量膨潤率と同様に EDC/NHS 架橋の影響によるものである。

Fig4-9 は Fig4-6 の「線維配向コラーゲンの実質濃度に対する弾性率」をプロットしたグラフ上に架橋コラーゲンの実質濃度に対する弾性率をプロットしたグラフである(緑で表記)。

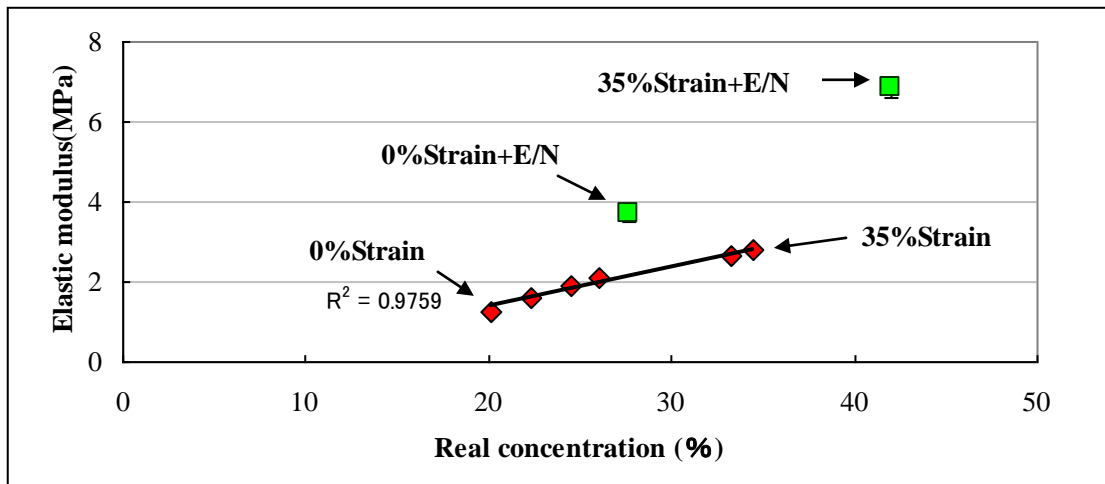


Fig4-9 架橋コラーゲンの実質濃度に対する弾性率

Fig4-6 と同様に実質濃度の増加が弾性率の増加へと繋がったが、線維配向コラーゲンの実質濃度に対する弾性率の線形的なグラフの上にはプロットされなかった。そのため、実質濃度依存以外の要因が挙げられる。本実験で用いた EDC/NHS 架橋は分子内、分子間、線維間における脱水縮合によるものである。その中の分子内、分子間架橋により、膨潤率を抑えただけではなく、線維自身の強度が増加したと考えられる。

また、歪 0%から歪 0%+EDC/NHS 架橋は弾性率が 2.91 倍、実質濃度が 1.38 倍となり、歪 35%から歪 35%+EDC/NHS 架橋は弾性率 2.45 倍、実質濃度が 1.21 倍となっている。どちらも同様な比率で増加しているが、歪 35%から歪 35%+EDC/NHS 架橋の方は歪 0%から歪 0%+EDC/NHS 架橋よりやや増加率が小さい。しかし、磁場によってコラーゲンを線維配向させ、その後 EDC 架橋を行なった際の架橋度は線維配向なしの場合が $45 \pm 5\%$ 、線維配向ありの場合が $42 \pm 7\%$ であり、線維配向の有無に関わらず架橋度は同値であるという報告がある³⁵⁾。本研究では架橋度の測定は行っていないが、このことから歪 0%から歪 0%+EDC/NHS 架橋と歪 35%から歪 35%+EDC/NHS 架橋の架橋度は同値であると考えられる。線維配向させたことにより膨潤率が小さくなり架橋剤が侵入しにくいことが要因として考えられるが、反対に線維間の距離が小さくなっているため架橋が進行されやすかったことも要因として考えられる。それ故に、どちらの条件が架橋されやすいかは断定することができない。よって、歪 0%から歪 0%+EDC/NHS 架橋と、歪 35%から歪 35%+EDC/NHS 架橋の弾性率、実質濃度の増加率の違いは誤差の範囲内であると考えられる。

Ⅲ型コラーゲン複合化材料の弾性率、伸長率

線維配向に EDC/NHS 架橋を行なったコラーゲンは弾性率が最大で 6.86MPa まで増加させることができたが、伸長率は 28.5%と減少してしまった。そのため、弾性率を維持したまま柔軟性の増加を目指した。結果 3-3-4 ではⅢ型コラーゲンは伸長率へ影響があることが確認されているため、Ⅲ型コラーゲンを複合化させた材料の影響を調査した。Fig3-27 と Fig3-28 は結果 3-4-3 の Fig3-17、Fig-3-18 と比較して弾性率が 2.80MPa、伸長率が 33.7%であった歪 35%の線維配向コラーゲンはⅢ型コラーゲンの複合化により弾性率は 2.95MPa とあまり変化はないが、伸長率が 52.2%へと増加が確認された。これは柔軟性のあるⅢ型コラーゲンの影響によるものである。Ⅲ型コラーゲンの複合化は線維配向コラーゲンの内部および表面上にランダムなⅢ型コラーゲンの線維が全体に薄くコーティングされている状態である。そのため、引張り方向に対しての弾性率にはⅢ型コラーゲンのランダムな線維は依存せず、線維配向コラーゲンの影響しか依存されなかったと考えられる。また、Ⅲ型コラーゲンの複合化はランダムな線維によって線維配向を内部および表面から束ねるような役割を担っていると考えられる。そのため、伸長したというよりも破断しにくい構造となり、伸長率の増加へ繋がったと考えられる。

また、結果 3-4-5 の Fig3-23、Fig3-24 と Fig3-27、Fig3-28 と比較して弾性率が 6.86MPa、伸長率が 28.5%であった歪 35%の線維配向に EDC/NHS 架橋を行なったコラーゲンは弾性率が 7.43MPa、伸長率が 40.2%となりどちらの増加も確認された。伸長率の増加については先程と同様な理由であると考えられるため、弾性率の増加傾向について考察する。先程と異なる点は EDC/NHS 架橋の有無であるため、線維配向コラーゲンが架橋されただけではなく、束ねているランダムなⅢ型コラーゲンの線維も同様に架橋されている状態である。つまり、弱いⅢ型コラーゲン線維に束ねられていた状態から、架橋された強固なⅢ型コラーゲン線維に束ねられた状態へと変わっている。また、線維配向したⅠ型コラーゲンとランダムなⅢ型コラーゲンの線維間にも架橋が進行していたと考えられる。これらの要因により、材料が強固となり、弾性率の増加へ繋がったと考えられる。

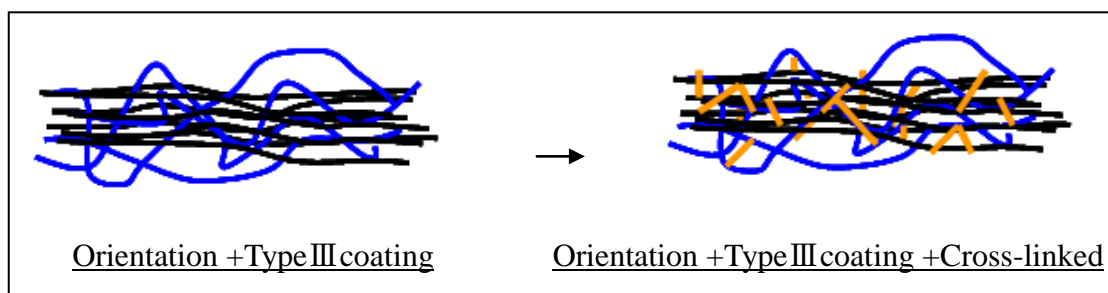


Fig4-10 Ⅲ型コラーゲン複合化材料

一方で、I型コラーゲンを同様の方法でコーティングしたとしても同じような結果が生まれると考えられる。しかし、結果 3-3-4 の Fig3-12 より、I型コラーゲンは強度を担い、III型コラーゲンは柔軟性を担うことが確認されている。また、血管外膜作製のためにはI型コラーゲンとIII型コラーゲンが共存するため、複合化した材料がより望ましいと考えられる。そのため、本研究ではIII型コラーゲンをを用いて柔軟性の増加を試みた。

さらなる高強度コラーゲン材料作製のために

本研究では最大 10MPa を有する血管外膜の弾性率を模倣した材料を作製するために、線維配向と分子架橋の 2 つのアプローチから試みた。再膨潤を繰り返した際に、歪を加えたまま乾燥させることで線維配向を作製することができ弾性率の増加が確認された。その上に EDC/NHS 架橋を行うことにより、さらに弾性率の増加が確認された。そして、III型コラーゲンを複合化することにより、柔軟性の増加と共に最大弾性率 7.43MPa まで作製することができた。しかし、血管外膜の弾性率最大 10MPa であり、靭帯や腱のコラーゲンの弾性率は更に高く数十 MPa から数百 MPa までに至る。そのため、さらなる高強度コラーゲン材料の作製が必要になってくる。

まずは、架橋剤の変更が挙げられる。生体内のコラーゲン線維で起きている架橋構造を生体外で再現することが望ましいが、それ以外にも細胞毒性が低く、生体内で安定性を保ちながら高い機械的強度を有する架橋剤を作製することができれば近づけることが可能になり得る。本研究室ではエラスチンゲルの力学的強度を持たせた材料の開発を EGDE やオリジナルの架橋剤である Dode-DSP を用いて成功している⁸⁾。そのため、線維配向コラーゲンにこれらの架橋剤を用いて架橋条件を検討することにより、更なる弾性率の増加が望めると考えられる。

次に配向度の増加以外に、線維をより密にし、更に膨潤を抑えた材料の作製方法が挙げられる。本研究ではフィルム化により線維を密にした。そして、Fig3-11 と Fig3-17 から線維配向コラーゲンを作製する際の再膨潤により、歪 0%においても弾性率の増加が確認されたことが手掛かりになりうるかもしれない。これは乾燥により線維の収縮が起きたものによると考えられるが、温度、湿度、時間等の乾燥条件や作製方法を検討することにより、更に線維を収縮させることができるかもしれない。

また、コラーゲンゲルに線維芽細胞培養することによって、線維の収縮が起き、培養開始から体積が大きく減少するという報告がある³⁷⁾。これは細胞骨格とコラーゲン線維が互いに張力を及ぼし合って、物理的な作用による収縮のみではなく、様々な化学的因子が網目の再構築に関与していると考えられている。また、フィブロネクチンがゲル収縮の因子として働く報告もある³⁸⁾。そのため、細胞のコラーゲン線維収縮による作用によって弾性率の増加が望めると考えられる。また、その際に

伸展などの生体内に近い環境で培養させることにより、より緻密な線維の再構築が起き、生体内コラーゲンの弾性率に近づく可能性があると考えられる。しかし、その際は線維の再構築の前に培養液や細胞が分泌するコラゲナーゼ等の酵素によって分解されにくい材料であることが必須になってくる。

エラスチンとの複合化材料

3層構造を有する理想的な人工血管作製のためには血管内膜を内皮細胞層、血管中膜はエラスチンゲル、血管外膜はコラーゲンの配向線維を用いて各々の材料を複合化する必要がある。特に、中膜のエラスチンゲルと外膜のコラーゲンとの接着部分が最も重要な問題である。実際の豚の大動脈の中膜と外膜は塩水で膨潤させた後に剥がせる程度であり、非常に強固に接合している。しかし、線維同士が絡んでいる形跡もなく、どのような結合状態によって維持されているかは不明である。このような3層構造を有する人工血管作製のために、円柱のコラーゲンとエラスチンの鋳型を作成し、凍結乾燥と膨潤、収縮により両者が分離することを抑えた材料を作製できるという報告もある³⁹⁾。エラスチンとコラーゲンの物性を変化させながら、このような方法を用いることは困難であるが、1つの手掛かりになりうるかもしれない。

一方、本研究によって作製できたコラーゲン材料の弾性率は最大で7.43MPaであり、その際の伸長率は40.2%であった。また、本研究室で作製した中膜弾性板に類似した力学的強度を持つエラスチンゲルの弾性率は150kPa~200kPa、伸長率は100%以上であり、物性値に差が大きい。そのため、両者の材料を複合化した際に、各々の影響が独立し、強く働いてしまう可能性がある。また、複合した材料は連動して働けなければいけないことや、長軸方向への引張りによる応力-歪曲線は緒言のFig1-11のようなJカーブを描く必要がある。そのため、複合化した材料はそのような物性値を保てられるかが重要になってくる。

そこで、複合化した際もエラスチン、コラーゲンが各々の特異的な物性値を保ちながら、長軸方向への引張りによる応力-歪曲線がJカーブを描くための方法を提案する。複合化した材料がJカーブを描くためには、最初の歪に対してはエラスチンの伸長に対する物性が寄与し、後の歪(Fig1-11では歪約90%以降)からはコラーゲンの剛性の物性が寄与する必要がある。つまり、エラスチン、コラーゲンとの順に各々の特異的な物性値を寄与できる材料であり、歪約90%まではコラーゲンの性質は寄与できない材料設計が必要である。

そのためには、各々の特性を活かした複合化が求められる。エラスチンの特異性は伸長であると同時に、破断点の手前の歪に対してはある程度は元の状態に戻る。コラーゲンの特異性は剛性であると同時に、弾性がないため、ある程度は縮まった

まま維持することが可能である。このような特性を利用し作製方法を考える。まずはエラスチンゲルに歪を加えたままの状態で作製したコラーゲン材料を自然長の状態で複合化させる。そして歪を加えた力を緩和させることによって、エラスチンゲルが自然長に戻り、コラーゲン材料が収縮された状態になる。このような複合化材料を長軸方向へ引っ張ることで、初めはエラスチンゲルが伸長すると同時にコラーゲン材料が自然長へと伸長される。そして、エラスチンゲルが最大伸長率である100~150%に達する前にコラーゲン材料が自然長に達し、エラスチンゲルは破断することなく、そこからコラーゲン材料が40%程伸長され、最大応力までに達する設計である。よって、この材料の応力-歪曲線は Fig4-11①のエラスチンゲルの物性による曲線と②のコラーゲン材料の物性による曲線が複合化されることにより、③のような理想のJカーブが描けると考えられる。

このような設計でエラスチンゲルとコラーゲン材料を複合化することで、血管中膜および血管外膜の物性を有し、かつ、血管本来の物性を有する材料を作製することが可能になると考えられる。そして、反対側のエラスチンゲルにIV型コラーゲンをコーティングさせ、内皮細胞の足場と共に内皮細胞層を作製することで、組織工学を目的とした3層構造を有する人工血管を作製することが可能になる(Fig4-12)。

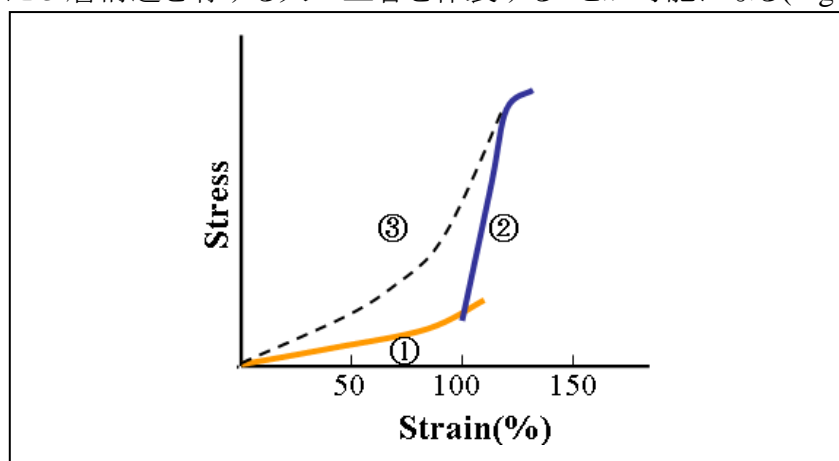


Fig4-11 エラスチンゲルとコラーゲン材料による応力-歪曲線

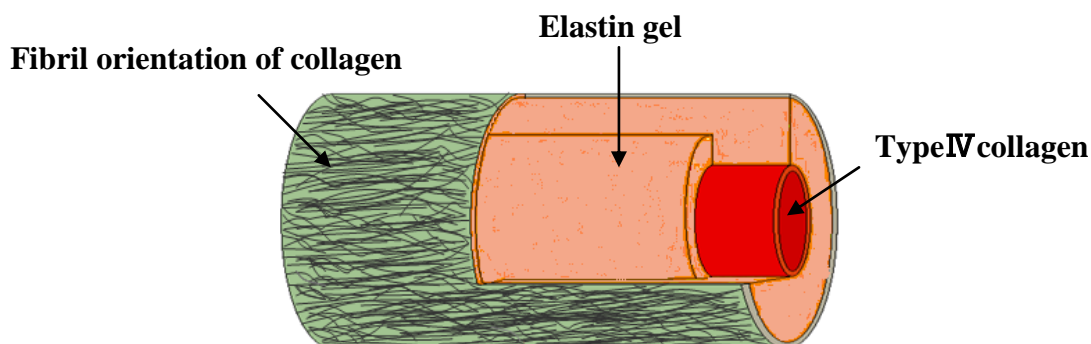


Fig4-12 内膜、中膜、外膜の3層構造を有する人工血管

結論

- I 型、III型コラーゲンの物性値の違いが示された。
(I 型は強度を持たせる。III型は柔軟性を持たせる。)
 - 線維配向したコラーゲン材料を作製することができ、実質濃度が弾性率に影響する
ことが示唆された。
 - 線維配向、架橋、III型コラーゲンの複合化により、弾性率が最大で 7.43MPa のコ
ラーゲン材料の作製に成功した。
- 以上より、血管外膜作製のためには両者のコラーゲンと線維配向の必要性が示
唆された。

謝辞

本研究および修士論文の作成を進めていく中で、懇切なご指導を賜りました三重大学工学部分子素材工学科生体材料化学研究室の堀内 孝教授、宮本 啓一准教授、事務員の村上 節子様には深く感謝致します。特に私の研究を担当して下さいました宮本 啓一准教授には感謝の念が絶えません。多忙にも関わらず、理解が未熟な点におきましても丁寧にご指導や助言をして頂き、研究に対する取り組み方や考え方などの多くのことを学ばせて頂きました。心より深く感謝致します。

また、研究室の先輩として研究に対する姿勢を示し、数多くのご指導や助言をして下さった水谷 直紀先輩、また同じ ECM をテーマとして、研究室に配属されてから実験や研究室生活において私を指導し成長させてくれた大原 健太郎先輩、石田 尚志先輩、羽多野 由季子先輩を始めとする諸先輩方にも深く感謝致します。

そして、同じ研究室で共に過ごした同期の大友 佳子さん、加藤 真司君、佐々木 剛君、野口 寛之君、東 洋君、堀井 貴司君、山本 光則君、塩崎 大介君、原吉彦君、高橋 国宏君には公私共に大変お世話になりました。深く感謝を致します。

M1 阿部 功児君、神谷 歩君、葛本 智淳君、境 淳志君、田野 裕美さん、中村 雅広君、丹羽 一喜君、原 拓也君、B4 伊藤 直人君、北村 早希さん、影山 聡志君、小山 直紀君、清水 佑典君、叢 秀娜さん、財部 龍太郎君、中町 信敏君、長谷川 まりなさんのおかげで毎日研究室生活を楽しく過ごすことが出来ました。先輩として至らない点があり、ご迷惑をお掛け致しました。感謝と共に謝罪致します。残りの研究室生活において皆さんの更なる成長を期待しています。

最後に研究室での生活および学校生活を心身ともに支えてくれた家族に心から感謝致します。

生体材料化学研究室で過ごした3年間において今後の糧となる貴重な経験を多くさせて頂き、本当にありがとうございました。今後の生活の中で更に私が成長していくことで、お世話になった方々へ感謝の念を示したいと思います。そして、素晴らしい研究室として今後も一層繁栄することを心から願っています。

参考文献

- 1) ARTHUR B. VOORHEES, *et al.* “THE USE OF TUBES CONSTRUCTED FROM VINYLON "N" CLOTH IN BRIDGING ARTERIAL DEFECTS” *Ann Surg*, 1952, Mar, 135(3):332-6.
- 2) 日本人工臓器学会 編集/人工臓器イラストレイティッド/はる書房
- 3) 中林 宣男・石原 一彦・岩崎 泰彦:共著/バイオマテリアル/コロナ社
- 4) Greenwald SE, Berry CL “Improving vascular grafts: the importance of mechanical and haemodynamic properties” *Pathology*, 2000,190:292–9.
- 5) 大谷 修、*et al.*:カラー図解 人体の正常構造と機能Ⅱ 循環器／日本医事新報社
- 6) 生化学データブックⅠ/日本生化学会編/東京化学同人
- 7) 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
- 8) 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
- 9) 宮坂 昌之・Bio Science／用語ライブラリー 細胞接着
- 10) Kato YP, Silver FH “Formation of continuous collagen fibers:evaluation of biocompatibility and mechanical properties” *Biomaterials*, 1990,11,169–75.
- 11) Olde Damink LHH *et al.* “Crosslinking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide” *Biomaterials*, 1996,17,765–73.
- 12) Tatsuo Ushiki *et al.* “Collagen Fibers, Reticular Fiber and Elastic Fibers. A Comprehensive Understanding from a Morphological Viewpoint” *Arch.Histol, Cytol*, Vol.65 No.2 (2002) p.109-126
- 13) 藤本 大三郎／コラーゲン物語／東京化学同人

- 14) Kate Stuart and Alyssa Panitch “Characterization of Gels Composed of Blends of Collagen I, Collagen III, and Chondroitin Sulfate” *Biomacromolecule*, 2009, 10, 25–31.
- 15) Cascone MG, *et al.* “Bioartificial polymer materials based on polysaccharides” *J Biomater Sci Polym Edn*, 2001,12,267–81.
- 16) Barbani N, *et al.* “Bioartificial materials based on blends of collagen and poly (acrylic acid)” *J Appl Polym Sci* 1999, 72, 971–6.
- 17) Olde Damink LHH, *et al* “Glutaraldehyde as a crosslinking agent for collagen-based biomaterials” *J Mater Sci Mater, Med*, 1995, 6, 460–72.
- 18) Sung HW, *et al* “Crosslinking of biological tissue using genipin and/or carbodiimide” *J Biomed Mater Res*, 2003, 64A,427–38.
- 19) Orban JM, Wilson LB, *et al* “Crosslinking of collagen gels by transglutaminase” *J Biomed Mater Res* 2004, 68, 756–62.
- 20) Segura T, *et al* “DNA delivery from hyaluronicacid–collagen hydrogels via a substrate-mediated approach” *Biomaterials*, 2005, 26, 1575–84.
- 21) Wissink MJB, *et al* “Immobilization of heparin to EDC/NHS-crosslinked collagen, characterization and in vitro evaluation” *Biomaterials*, 2001, 22, 151–63.
- 22) Perper JS, *et al* “Development of tailor-made collagen-glycosaminoglycan matrices: EDC/ NHS crosslinking, and ultrastructural aspects” *Biomaterials* 2000, 21, 581–93.
- 23) Jaworski J, *et al* “Fibroblast remodeling activity at twoand three-dimensional collagen–glycosaminoglycan interfaces” *Biomaterials* 2006, 23, 4212–20.
- 24) Olde Damink LH, *et al* “Cross-linking of dermal sheep collagen using a water-soluble carbodiimide” *Biomaterials* 1996, 17, 765–73.
- 25) Collagen Fibers, Reticular Fibers and Elastic Fibers. A Comprehensive

Understanding from a Morphological Viewpoint Arch.Histol.Cytol. 65 NO.2 (2002)
109-126

26) Bell.E *et al.* Acod. Sci USA, 76 1274-1278(1979)

27) A.K.Harris *et al.* Embryol.exp.Morphol, 80, 1(1984)

28) Jiang F *et al.* “Assembly of collagen into microribbons: effects of pH and electrolytes” J Struct Biol, 2004, 148:268–78.

29) Matthews JA, *et al.* “Electrospinning of collagen nanofibers” Biomacromolecules, 2002,3,232–8.

30) Lowik DWPM *et al.* “A highly ordered material from magnetically aligned peptide amphiphile nanofiber assemblies” Adv Mater 2007, 19,1191–5.

31) 岡井 正典／エラスチンゲルの力学特性の制御／平成 19 年度修士論文

32) Trelstad, R. L. (1982) Immunochemistry of the Extracellular Matrix, vol. I (ed. Furthmayr, H.) pp.31-41

33) 永井 裕、藤本 大三郎／コラーゲン実験法／講談社

34) J. Kyte *et al.* “A simple method for displaying the hydropathic character of a protein” J Mol Biol 1982, May 5,157(1) 105-32

35) “Bioinformatics explained: Hydrophobicity” CLC bio December 17, 2005

36) S. Chen *et al.* “Microstructures and rheological properties of tilapia fish-scale collagen hydrogels with aligned fibrils fabricated under magnetic fields” Acta Biomaterialia 2010

37) Ulrika Zagai *et al.* “Platelets stimulate fibroblast-mediated contraction of collagen gels” Bio Med central 17 October 2003.

38) Bell E *et al.* “ Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro” *Cell Biology* 1979, 76:1274-1278.

39) M.J.W.Koens *et al.* “Controlled fabrication of triple layered and molecularly defined collagen/elastin vascular grafts resembling the native blood vessel” *Acta biomaterialia* 6 (2010) 4666-4674.

付録

・Western blotting 法 プロトコル

◎目的

目的のタンパク質を電気泳動による分離と抗原抗体反応の組み合わせで高感度に検出し、定量する方法

◎操作の流れ

1. SDS-PAGE * 電気泳動で分子量ごとに分離させる
↓
2. ウェスタンブロッティング * ゲル中のタンパクを膜に転写させる
↓
3. 一次抗体 * 目的のタンパク質を特異的に認識させる
↓
4. 二次抗体
↓
5. バンドの定量

◎測定の原理

・SDS-PAGE

SDSは水溶性タンパク質1g当たり約1.4g結合してSDS-タンパク質複合体を形成します。タンパク質分子自身を持つ電荷はSDSとの結合によってほとんど打ち消されている。また、還元剤である2-メルカプトエタノールによってタンパク質のS-S結合(ジスルフィド結合)が切断され、SDSが結合したタンパク質の形状はほぼ直鎖状になっているため、タンパク質分子の本来の形状は移動速度に影響を及ぼさない。これらのことから、ゲル内でのタンパク質の移動のしやすさは分子の大きさとそれに比例した負電荷の量にのみ左右され、分子量に従って分離することができる。

1. SDS-PAGE による蛋白質の分離

[使用器具・試薬]

- ・ゲル板(前面ガラス板、ミミ付ガラス板)、シリコンガスケット、プラスチック製クリップ、
コーム、電気泳動槽(AE-6410 型, ATTO)、電源装置(クロスパワー500, ATTO)
- ・Tris(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)、SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、HCl、アクリ
ルアミド、Bis (N,N'-メチレンビスアクリルアミド)、APS(過硫酸アンモニウム)、グリシ
ン、BPB(ブロムフェノールブルー)、2-メルカプトエタノール、グリセロール、
TEMED(N,N,N',N' -テトラメチルエチレンジアミン)、分子量マーカー(HMW
SDS Marker Kit, Amersham)、MagicMark XP ウェスタンブロットタンパク質スタンダード
(Invitrogen)

[操作]

1) 電気泳動用試薬の調製

・1.5M Tris-HCl (pH8.8), 0.4% SDS

Tris 54.5g、SDS 1.2g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 17ml)を加えて pH8.8 に合
わせ、脱イオン水で 300ml にメスアップする。

・0.5M Tris-HCl (pH6.8), 0.4% SDS

Tris 6.0g、SDS 0.4g を脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 9ml)を加えて pH6.8 に合
わせ、脱イオン水で 100ml にメスアップする。

・30%アクリルアミド溶液

アクリルアミド 58g、Bis 2.0g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 200ml にメスア
ップする。

・0.4% SDS

SDS 0.2g に脱イオン水 50ml を加えて溶解する。

・10%APS

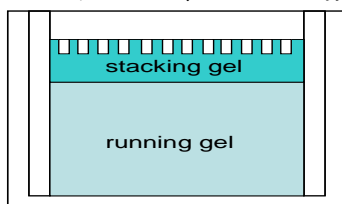
APS 0.1g に脱イオン水 1ml を加えて溶解する。

・泳動バッファー

Tris 3.0g、グリシン 14.4g を脱イオン水に溶かし、脱イオン水で 1000ml にメスア
ップする。その後、SDS 1.0g を加え、溶解させる。

・サンプルバッファー

0.5M Tris-HCl (pH6.8) 2ml、0.4% SDS 4ml、2-メルカプトエタノール 1.2ml、グリ
セロール 2ml、脱イオン水 0.8ml、0.1%BPB 数滴を混ぜる。



2) ゲル板の組み立て

- ① 前面ガラス板とミミ付ガラス板、シリコンガスケットをエタノールで拭く。



前面ガラス板



ミミ付ガラス板



シリコンガスケット

ト



コーム



クリップ

- ② ミミ付ガラス板にシリコンガスケットをセットし、前面ガラス板をのせて、クリップでとめる。



- ③ コーム(comb)を差し込み、コームの下底から 5mm のところに目印を入れる。

3) running gel、stacking gel の作製

REAGENT	アクリルアミド濃度(%)				
	Running gel				Stacking gel
	5%	7.5%	10%	12.5%	4.5%
分画分子量範囲	30~200kDa	40~200kDa	20~130kDa	14~80kDa	—
30% アクリルアミド溶液	2.0ml	3.0ml	4.0ml	5.0ml	0.9ml
1.5M Tris- HCl(pH8.8), 0.4%SDS	3.0ml	3.0ml	3.0ml	3.0ml	—
0.5M Tris- HCl(pH6.8), 0.4%SDS	—	—	—	—	1.5ml
APS	120 μ l	120 μ l	120 μ l	120 μ l	60 μ l
TEMED	12 μ l	12 μ l	12 μ l	12 μ l	6 μ l
脱イオン水	7.0ml	6.0ml	5.0ml	4.0ml	3.6ml
Total Volume	12.0ml	12.0ml	12.0ml	12.0ml	6.0ml

- * 目的とするタンパク質の分子量に対応して、ゲル濃度を決定する。
- * 表はゲル 1 枚分の量を示している。
- * アクリルアミドのモノマーは神経毒であるので、試薬を扱う時は手袋、マスクを着用する。

- ① running gel 溶液、stacking gel 溶液を上表に従って作成する。(但し、TEMED はこの時点では加えない)
- ② running gel 溶液をアスピレーターで脱気する。(1~2 時間程度)
- ③ 脱気後、TEMED 12 μ l を加え、軽く混ぜる。
 - * 微量なのでピペット操作は要注意。
- ④ 素早く、2)で準備したゲル板の目印のところまで running gel 溶液を入れる。
 - * フラスコから直接注ぎ込む。
- ⑤ ピペットで脱イオン水をゲル液面上に重層する。
- ⑥ ゲル化するまで静置する。(1 時間程度)
 - * アクリルアミドは 20 $^{\circ}$ C 以下では重合しにくいいため、室温に注意。(特に冬期は注意)

- * ゲルと水の界面ができていればゲル化しているので、水を捨ててキムワイプで軽く拭く。

- ⑦ ゲル化させている間に stacking gel 溶液をアスピレーターで脱気する。
- ⑧ 脱気後、TEMED 6 μ l を加え、軽く混ぜる。
- * 微量なのでピペット操作は要注意。
- ⑨ 素早く、ミミ付ガラス板の切り欠きの少し下まで stacking gel 溶液を入れる。
- ⑩ コームを気泡が入らないように差し込み、1 時間静置してゲル化させる。
- * コームを両手で持ち、水平に差し込む。

4) 各ウェルにローディングする試料溶液の調製

- ① 各ウェルに加えるタンパク量に相当する試料の体積を BCA 法により測定した濃度から算出する。
- ② ①で算出してタンパク量とサンプルバッファーを 1:1 で混合する。
- ③ ボルテックスで攪拌する。
- ④ 100°C の熱湯で 3 分間ボイルする。
- ⑤ ボルテックスで攪拌する。

5) 電気泳動

- ① 電気泳動槽に底から(陽極側)泳動バッファーを入れる。
- ② ゲル化したらコームをそとと抜き取る。
- ③ クリップとシリコンガスケットを外し、ゲル板を締め付け具に固定し、電気泳動槽に入れる。
- ④ ゲルの上部(陰極側)が十分に浸るぐらい電解槽液を入れる。
- ⑤ シリンジを用いて、ウェルを電解槽液で洗浄する。
- ⑥ サンプルをピペットでウェル内にゆっくり注入する。
- * ガラスにマジックでサンプル番号を書くと見やすい。
- * 分子量マーカ―はサンプルバッファーを加えずに、分子量マーカ―5 μ l 注入。
Magicmarker は、最終的に発現物質の分子量を確認しなければならない時に 3 μ l 流す。
- ⑦ 電極端末を接続し電源を入れ、ゲル 1 枚のときは 15mA の定電流で、ゲル 2 枚のときは 30mA の定電流で泳動する。
- * BPB 線がゲル下端から 5mm の位置にくるまで泳動する。

2. ゲルから膜への転写(Western blotting)

[使用器具・試薬]

- PVDF 膜(ポリフッ化ビニリデンメンブレン)、ブロットイング濾紙、ブロットイング装置
- Tris(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)、メタノール、6-アミノカプロン酸

[操作]

1) 試薬の調製

•A 溶液(0.3%M Tris 5%メタノール溶液)

Tris 3.6342g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

•B 溶液(トランスファーバッファー)

まず、10xトランスファーバッファー(Tris:15.15g グリシン:72.05g SDS:0.5g を 500ml の脱イオン水に溶かす)を作成する。

その後、10x トランスファーバッファー:50ml + メタノール:100ml + 脱イオン水:350ml を混ぜる。

•C 溶液(25mM Tris 40mM 6-アミノカプロン酸 5%メタノール溶液)

Tris 0.3029g、40mM 6-アミノカプロン酸 0.5247g を脱イオン水 50ml に溶かし、5ml のメタノールを加えて、最後に脱イオン水を加えて計 100ml とする。

2) Western blotting

- ① 電気泳動終了前に、PVDF 膜を running gel と同じ大きさに切り、メタノールに 30 秒ほど浸し、次に B 溶液に浸し 30 分ほど振盪させる。
- ② さらに、電気泳動終了前に、ブロットイング濾紙 6 枚を running gel と同じ大きさに切り、A 溶液に 2 枚、B 溶液に 1 枚、C 溶液に 3 枚浸す。
- ③ 電気泳動終了後、ガラス板の隙間にスパチュラを差し込み、この原理でガラス板をはがす
- ④ stacking gel を取り除き、running gel 部分のみにして、脱イオン水で軽く洗浄した後、B 溶液に 10 分間浸す。
- ⑤ 準備してあったブロットイング濾紙で、まず A 溶液に浸した濾紙 2 枚をブロットイング装置にのせる。さらに、B 溶液に浸した濾紙 1 枚、PVDF 膜、ゲル、C 溶液に浸した濾紙 3 枚の順に上へ重ねる。
- ⑥ グローブをはめ、手のひらで全体を押しつぶすように気泡を抜き、膜とゲルを密着させる。
- ⑦ 一番上の濾紙に C 溶液をかけ、陰極板をセットし、リード線をつなぐ。
- ⑧ ゲルの面積 1cm^2 あたり 2mA の定電流で約 40 分間ブロットイングする。
- ⑨ 膜を脱イオン水で軽く洗浄し、乾燥させる(overnight)。

3. 抗体処理

[使用試薬]

•PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal(東洋紡)、PBS、TritonX-100、PBS 粉末、Immunoreaction Enhancer Solution1(東洋紡)

I 型コラーゲンの場合 : anti-Collagen Type I (Rabbit)Minimum Cross Reactivity to Type II, III,IV,V and VI Collagens.

III型コラーゲンの場合 : anti-Collagen TypeIII(Rabbit)Minimum Cross Reactivity to Type I, II,IV,V and VI Collagens.

3-1). 一次抗体

[操作]

1) 試薬の調製

•PBS

PBS 粉末を脱イオン水に溶解して全量を 1000ml にする。

•0.1%PBST

PBS 10に Triton1.0ml を加える。

•一次抗体

Immunoreaction Enhancer Solution1(東洋紡)1ml に一次抗体 1 μ l を加え 2000 倍希釈する。

2) 操作

① PVDF Blocking Reagent for Can Get Signal をサランラップに 3ml 置き(膜の大きさに量を調節)、タンパク面を溶液に浸してサランラップを包み、常温で 20 分ブロッキングする。

② PBST で 5 分洗浄を 3 回繰り返す。(室温)

③ サランラップにパラフィルムを乗せ、その上に一次抗体溶液を乗せ、タンパク面を溶液に浸してサランラップを包み、4℃で overnight。

※一次抗体を良く結合させたい場合は overnight。時間を短縮したい場合は、常温で 1 時間静置して、次の作業を開始する。(overnight を推奨)

3-2). 二次抗体

[操作]

1) 試薬の調製

•二次抗体

Immunoreaction Enhancer Solution2(東洋紡)2ml に HRP 標識二次抗体 (HRP-Goat anti-Rabbit IgG(H+L))を 1 μ l 加え、2000 倍希釈する。

•ECL

1 液と 2 液を必要量とる。測定直前に混ぜる。

* アルミで遮光、氷上

* 1 液と 2 液は等量混ぜ、 $0.125\text{ml}/\text{cm}^2$ を目安に ECL の量を決める。

2) 操作

① PBST で 5 分毎に3回洗浄。(バックグラウンドに影響するため、しっかりと洗浄すること)

② サランラップにパラフィルムをセットし、その上に二次抗体溶液を乗せてタンパク面を重ねるようにして PVDF 膜をのせ、室温下で 15 分静置させる。

* 抗体溶液が移動しないように水平にセットする。

③ ①の操作を行う。

4. バンドの定量

[使用器具・試薬]

- ルミノイメージアナライザー(LAS-4000 mini EPUV,FUJIFILM)
- ECL (Enhanced ChemiLuminescence)

[操作]

- ① 洗浄した膜をラップ上にのせる。
- ② ECL の 1 液、2 液を混ぜ、膜上に添加する。
 - * 3 分間静置させる。
- ③ 新しいラップ上に膜を移し、ラップで包み込む。
 - *しわがつかないように包む
- ④光にさらさないように箱に入れて、ルミノイメージアナライザーの場所へ行く。

[ルミノイメージアナライザーの操作方法]

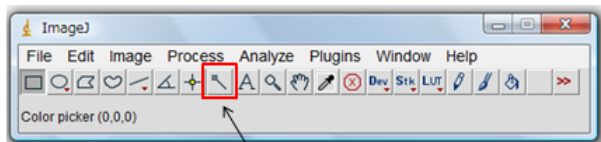
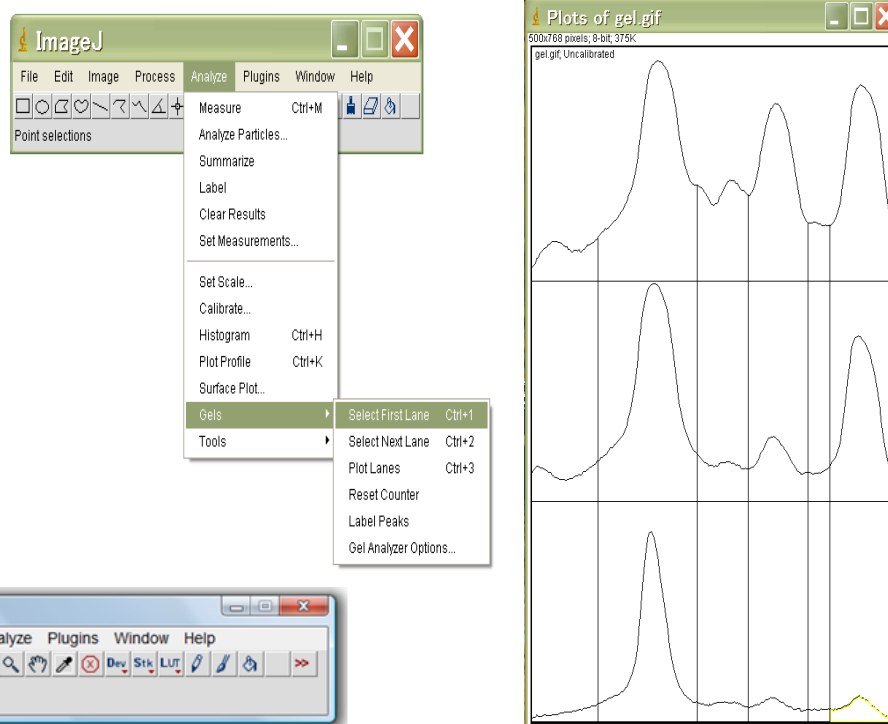
※予約表と使用表に名前などを記載すること(ルミノイメージアナライザーの横のファイルに紙が入っている)

- ① 装置の電源と、コンピュータの電源を付ける。
- ② ルミノイメージアナライザーのアイコンを選択し、装置が-25℃に設定されるまで待機。
- ③ 膜をセットする。
 - ※分子量マーカーが真っ直ぐ縦になるように膜をセットすると定量化の際便利
- ④ Method/Tray position を選択し、Chemiluminescence、EPIにチェックが入っていることを確認する。
- ⑤ Tray position を、選択したポジションの番号にチェックを入れ、OKを押す。
- ⑥ Focusing を選択し、明るさや焦点を合わせる。
- ⑦ Exposure Type を Precision あるいは Increment を選択。
 - Precision: 光を指定時間照射し、1 枚だけ写真を撮影する
 - Increment: 指定時間毎に写真を撮影し、画像を積み重ねていく
- ⑧ 時間を指定し、Start を押す。
- ⑨ 画像を保存する際、1 枚目から最後の画像までを保存するように指定し、Next を押し、保存先を指定した後に 8bit Tiff file に保存方法を変更して保存する。
- ⑩ USB に画像を入れて持ち帰る。

* Image Jによる定量方法

<使用方法>

- ① 四角くレーンを選択する(できるだけ小さく囲う)
- ② Analyze ⇒ Gels ⇒ Select First Lane を選択
- ③ Analyze ⇒ Gels ⇒ Select Second Lane を選択し、次のレーンを選択
- ④ 測定したいレーンを③を繰り返す
- ⑤ Analyze ⇒ Plot Lane を選択
- ⑥ グラフ化されて表示される
- ⑦ 調べたい部分の面積をクリックすることで面積が表示される
- ⑧ コントロールを 1 として比でグラフ化を行う

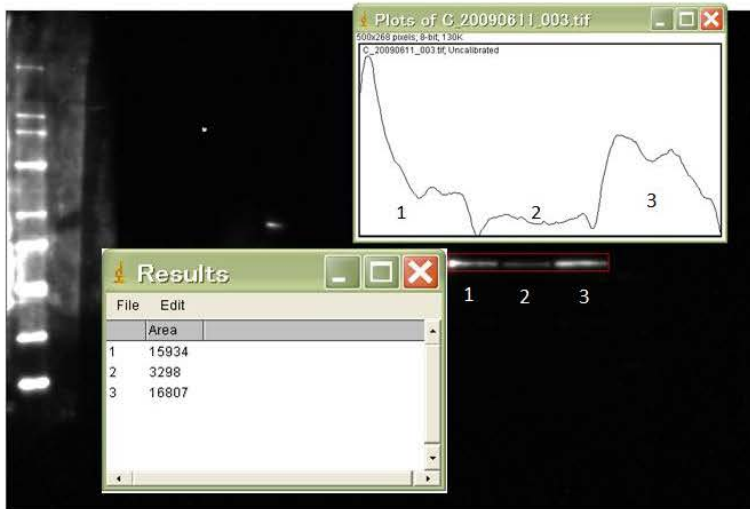


このボタンを押して、知りたい面積部分をクリック

The 'Results' window displays a table with the following data:

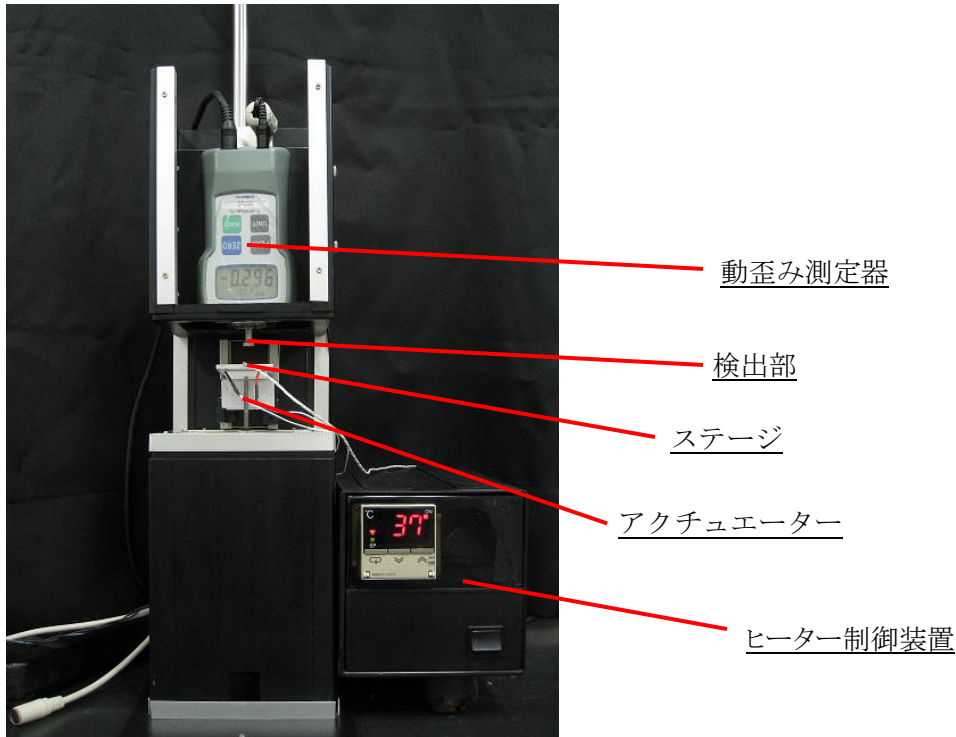
File	Edit
1	19940
2	11912
3	13318
4	18099
5	4229
6	10185
7	10656
8	1597
9	1481

結果例

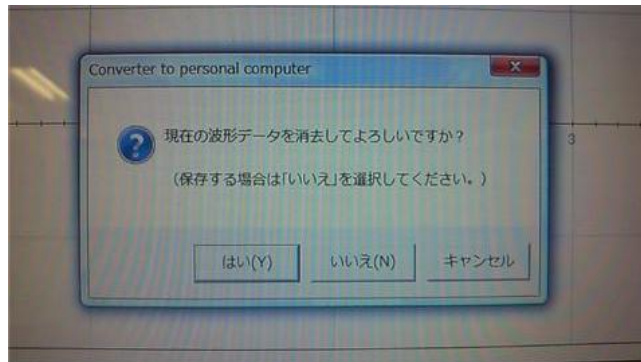


・弾性率測定方法(圧縮試験)

圧縮試験機



- (1) ヒーターを 37°C になるように設定する。
- (2) 動歪み測定器の POWER を押す。
- (4) Excel: ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動する。
- (5) [Open Com Port and Renumber] をクリックする。
- (6) 全アナログ変換測定器を起動する。
- (7) 第 1 チャンネルにチェックを入れて、空欄に次のように入力した後、[設定]→[はい] とクリックする。
計測器の名称[FG] / 信号の種類[±1V] / 計測値の名称[F]
計測信号の範囲 min[-1] / max[1] / 信号の単位[V]
計測値の範囲 min[-1982.6] / max[1982.6] / 計測値の工業単位[mN]
小数部桁数[1 桁] / サンプルング時間[0.1 秒]
- (8) 右下の[スタート] を押し、③ で設定した値が読み取られているか、測定値側のアームを軽く押したときにグラフが変化するかを確認した後、[ストップ] を押す。
- (9) もう一度スタートを押し、下図のウィンドウを出す。



- (10) サンプルの自然長(厚み)を測定した後、ステージに載せ、検出部にサンプルが触れるまでステージを上昇させる。
- (11) Zaber への [Execute Command Sheet] をクリックする。
- (12) [OK] を 2 度クリックする。
- (13) (9) で出した全アナログ への [はい] をクリックし、グラフの目盛が表示されるのと同じ時に、Zaber への [OK] を再度クリックし、測定を開始する。(全アナログ へのウィンドウをずらして [OK] の近くに配置しておくとうり易い)
- (14) サンプルが破断するまで測定を続ける。
- (15) サンプルが破断したら、ESC を押し、アクチュエーターを停止させる。
- (16) 全アナログ への [ストップ] を押した後、[ファイル] → [ファイル出力] を選択し、Excel: data に保存する。
- (17) Excel: data を起動し、B 列の数値データを全てコピーする
- (18) Excel: 応力歪み曲線を起動し Sheet2 の A 列に(17)でコピーした数値データを [形式を選択して貼り付け] → [リンク貼り付け] で貼り付ける。
- (19) 出力された D 列・E 列をコピーし、Sheet1 の Δl (mm)、F(mN)の欄に張り付ける。
- (20) (10) で測定した自然長 l の値を Sheet1 の指定のセルに入力する。
- (21) 得られた近似曲線の傾きを弾性率(Pa)として記録する。
- (22) サンプルを交換して測定する場合は測定済みのサンプルを取り外し、
(10)～(21)の工程を繰り返す。

* 破断点を測定する場合は、(1)～(3)は同様の操作である。操作(4)で破断測定 Excel: ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動させる。(5)～(16)までは同様の操作である。

(17) Excel: data を起動し、B 列の数値データのマイナスになる数字の 1 つ前の数値から全てコピーする。

(18) Excel: 破断点測定テンプレートを起動し、sheet1 の B 列に(17)でコピーした数

値データを貼り付ける。

(19)(10)で測定した自然長を指定のセルに入力する。

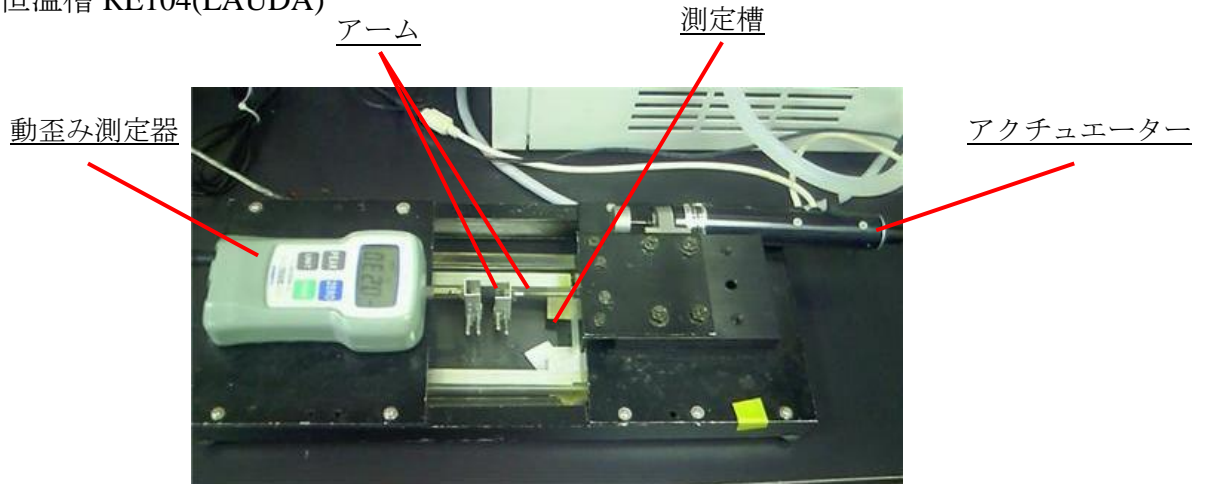
(20)グラフの波形の変化から破断点を読み取る。

弾性率測定方法(引張り試験)

○使用機器

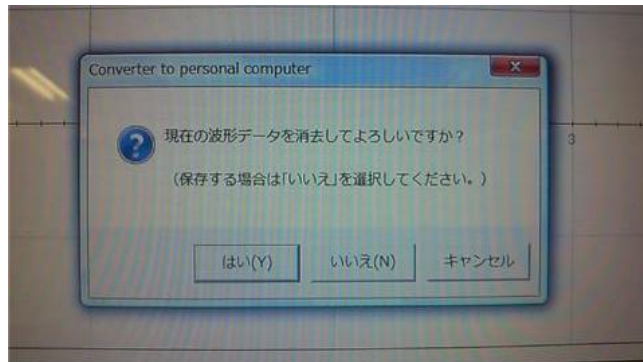
弾性率測定器(下図参照)

恒温槽 RE104(LAUDA)



弾性率測定器

- (1) ウォーターバスと測定槽とを接続し、測定槽を脱イオンで満たす。
- (2) ウォーターバスを 40°C になるように設定し、測定槽を暖めておく。
- (3) 動歪み測定器の **POWER** を押し、測定器側のアームを軽く押してから **ZERO** を押す。(アームから手を離したときに -0.230 など、適当な値が表示されればよい)
- (4) Excel: ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動する。
- (5) [Open Com Port and Renumber] をクリックする。
- (6) 全アナログ変換測定器を起動する。
- (7) 第 1 チャンネルにチェックを入れて、空欄に次のように入力した後、[設定] → [はい] とクリックする。
計測器の名称[FG] / 信号の種類[±1V] / 計測値の名称[F]
計測信号の範囲 min[-1] / max[1] / 信号の単位[V]
計測値の範囲 min[-50000] / max[50000] / 計測値の工業単位[mN]
小数部桁数[1 桁] / サンプルング時間[0.1 秒]
- (8) 右下の[スタート] を押し、③ で設定した値が読み取られているか、測定値側のアームを軽く押したときにグラフが変化するかを確認した後、[ストップ] を押す。
- (9) もう一度スタートを押し、下図のウィンドウを出す。



- (10) サンプルの断面積を測定した後、アームに挟み、アーム間のサンプルの長さを自然長として計測する。
- (11) Zaber への [Execute Command Sheet] をクリックする。
- (12) [OK] を 2 度クリックする。
- (13) (9) で出した全アナログ への [はい] をクリックし、グラフの目盛が表示されるのと同じ時に、Zaber への [OK] を再度クリックし、測定を開始する。(全アナログ へのウィンドウをずらして [OK] の近くに配置しておくとうり易い)
- (14) サンプルが破断するまで測定を続ける。
- (15) サンプルが破断したら、ESC を押し、アクチュエーターを停止させる。
- (16) 全アナログ への [ストップ] を押した後、[ファイル] → [ファイル出力] を選択し、Excel: data に保存する。
- (17) Excel: data を起動し、B 列の数値データを全てコピーする
- (18) Excel: 応力歪み曲線を起動し Sheet2 の A 列に(17)でコピーした数値データを [形式を選択して貼り付け] → [リンク貼り付け] で貼り付ける。
- (19) 出力された D 列・E 列をコピーし、Sheet1 の Δl (mm)、F(mN) の欄に張り付ける。
- (20) (10) で測定した断面積 A・自然長 l の値を Sheet1 の指定のセルに入力する。
- (21) F(mN) の値が急激に下がった点以降のデータを削除し、得られた近似曲線の傾きを弾性率(Pa)として記録する。
- (22) F(mN) の値が急激に下がる前の点の Δl (mm) 値と自然長 l を用いて、次式より伸張率(%)を求める。
- $$\text{伸張率}(\%) = (\Delta l / l) \times 100$$
- (23) サンプルを交換して測定する場合は測定済みのサンプルを取り外し、(10)～(22)の工程を繰り返す。

・走査型電子顕微鏡(SEM)撮影方法

t-BuOH 用凍結乾燥器使用法

○使用機器

VFD-21S(Vacuum devise inc.)



- (1) 後部のトラップコップを水で満たす。
- (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℃になるまで待つ。
- (3) 4℃になったら予め t-BuOH 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、30min 待つ。
- (4) EVAC をオンにし、乾燥を開始する。周囲の氷がなくなるまで待ち、内部までしっかり乾燥させる為、そこから 30min 放置する。
- (5) 30min 経過したら、温度スイッチを WARM に合わせ、温度が 30℃になるまで放置する。
- (6) スイッチを中点に戻した後、EVAC をオフにして吸引を停止する。
- (7) 乾燥が終了したサンプルはデシケーター内で保存し、吸湿しないようにする。

イオン Sputter 使用法

○使用機器

- ・日立イオン Sputter E1010



- (1) SEM 用の試料台に両面テープでサンプルを固定する。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る。
- (2) 試料台の裏側(ねじ穴のある側)にシャープ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ておく。
- (3) 金 Sputtering 用の台座にサンプルを試料台ごとセットする。もし台座に空きができるようならテープで塞いでおく。
- (4) イオン Sputter の MAIN VALVE を開き、台座をセットし、POWER をオンにして、圧力が 10Pa まで下がるのを待つ。
- (5) 10Pa になり、Ready のランプが点灯してから 1~2 分待ち、Sputter 時間を 120sec に set を押す。
- (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、試料台を取り出す。

SEM 撮影法

使用機器

- ・パソコン

- ・日立走査型電子顕微鏡 S4000

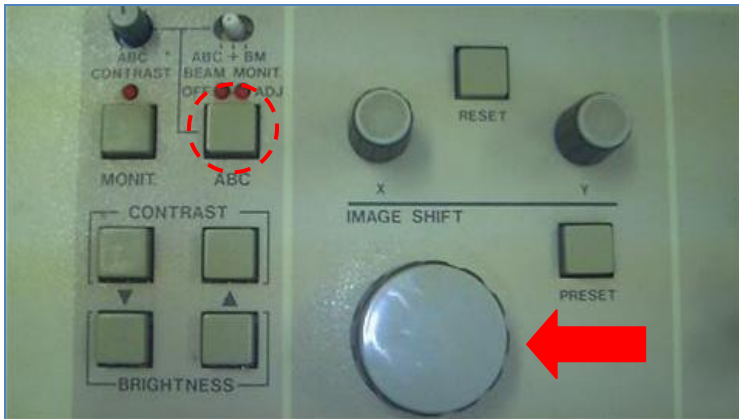


- (1) 撮影前に装置内部の試料台が $x=12.5$ 、 $y=12.5$ 、傾き=0 の位置にある事を確認する。
- (2) displaypower とカメラの電源を入れる。また、パソコンの電源を入れ、EOS utility を起動させる。
- (3) サンプルを高さ調整台に乗せ、固定台と固定する。
- (4) EVAC を押し内部を真空状態にする(基本的に真空状態になっている)。
- (5) 左上部のレバーが CLOSE になっていることを確認してから、AIR を押す。
- (6) 前室部分を開き、固定台を棒にセットする。
- (7) 棒を固定して、前室部分を閉じ、EVAC を押して真空にする。
- (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る
- (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 にする。
- (10) キーボード左上端にある HV の ON を押す。



- (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る。

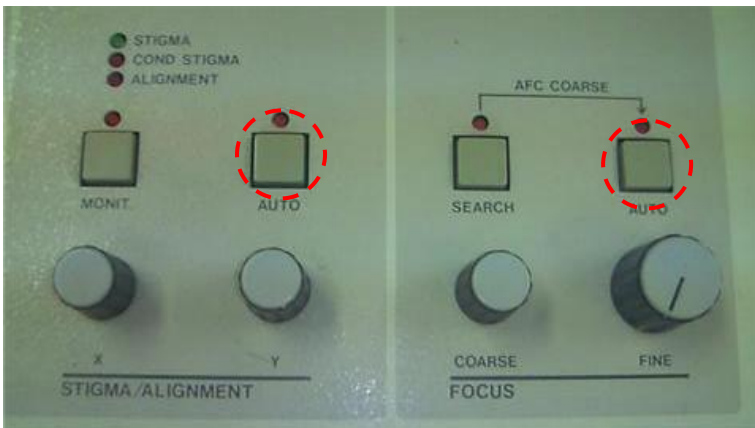




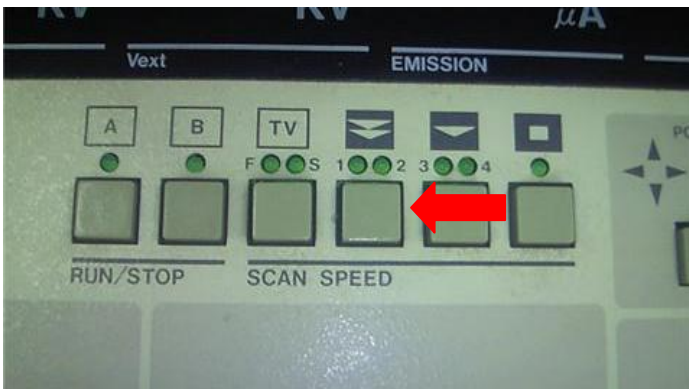
(12)本体のつまみを回して画像を動かし、サンプルを探す。

(13)MAGNIFICATION のつまみ(上図矢印)を回し、撮影倍率を決定する。

(14)STIGMA: AUTO→FOCUS: AUTO の順で押していき、画像のピントを調整する。



(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する。



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



(17)ピーと音が鳴ったら、シャッターを閉じる。するとパソコン画面の 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する。

(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 にする。



(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す。

(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う。

(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する。