

平成 23 年度 修士論文

細胞包埋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

佐々木 剛

# 目次

<b>1 緒言</b> .....	<b>1</b>
1-1 再生医療と組織工学.....	1
1-2 細胞外マトリックス.....	2
1-3 エラスチン(Elastin).....	2
1-3-1 エラスチン.....	2
1-3-2 エラスチンヒドロゲル.....	4
1-4 末梢神経再生.....	5
1-4-1 人工神経.....	5
1-4-2 再生への戦略.....	6
1-5 本研究の目的.....	7
<b>2 方法</b> .....	<b>8</b>
2-1 水溶性エラスチンの抽出と分類.....	8
2-1-1 水溶性エラスチンの抽出.....	8
2-1-2 水溶性エラスチンの分類(分画エラスチン).....	8
2-2 エラスチンのゲル化時間測定.....	8
2-3 エラスチンゲルの内部構造観察.....	9
<b>3 結果</b> .....	<b>10</b>
3-1 水溶性エラスチンの分類.....	10
3-2 エラスチンのゲル化時間測定.....	10
3-2-1 クラス別エラスチンのゲル化時間.....	10
3-2-2 混合エラスチンのゲル化時間.....	11
3-2-3 混合エラスチン AE のゲル化時間.....	11
3-3 エラスチンゲルの内部構造観察.....	12
3-3-1 各クラスのエラスチンゲルの内部構造.....	12
3-3-2 混合エラスチンゲルの内部構造.....	13

4 考察	18
4-1 エラスチンのゲル化	18
4-2 混合エラスチンゲル	21
4-3 エラスチン A と E の関係性について	22
5 結論	23
6 参考文献	24
7 謝辞	25
8 付録	26

# 1 緒言

## 1-1 再生医療と組織工学

事故や病気で治療困難な大きな損傷した場合、組織や臓器の代替が必要になる。そのため現在、臓器移植や人工臓器などで代替が行なわれている。しかし、これらの治療法では、ドナー不足問題、拒絶反応等の生体適合性による問題や回復が十分でないなどの問題があり、限界がある。これらの問題を解決する方法として、再生医療が注目されている。

再生医療とは失われた身体の細胞、組織、器官の再生や機能の回復を目的とした医療である。特にどんな細胞にもなる幹細胞を用いて組織、器官の再生をさせようという研究が盛んに行われている。この再生医療の1つに組織工学がある。

組織工学は、はじめに組織や臓器の機能を再生させるための「細胞」、次にその細胞の増殖や分化するための足場となり、組織や臓器を支持する「足場材料」、最後に細胞の増殖や分化を制御する「サイトカイン」の3つの要素からなる(図 1-1)。これらの要素が密接に関連しあうことで組織工学が成立するとされる。

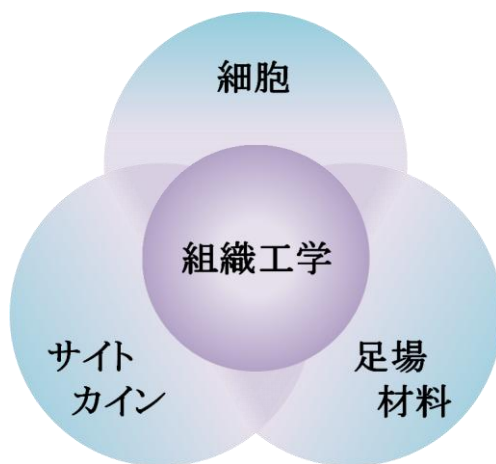


図 1-1 組織工学の三つの要素

## 1-2 細胞外マトリックス

多細胞生物においては、組織中の細胞と細胞の間、あるいは細胞集団と細胞集団の間の隙間を埋める物質が必要となる。この物質を細胞外マトリックス (ECM: extra cellular matrix) と呼び、細胞の外側で細胞どうしの接着や引張り、および圧縮などの外圧に対抗するための強度を持った物質の総称である。ECM は細胞が存在するところには必ず存在しているため、全身のあらゆる臓器に存在しており、臓器の支持や、境界をつくる役割をしている。その他の働きとして ECM は細胞の生存環境を形成しているため、細胞の移動、接着、分化、増殖にも関係している。そのため、ECM と発生、創傷治癒、生体防御、組織構築、免疫反応に関連した生命活動にかかわる学問が近年注目されている<sup>1)</sup>。

ECM の主要成分には、コラーゲン、エラスチン、プロテオグリカン、フィブロネクチン、ラミニン等の線維状タンパク質や糖タンパク質が挙げられるが、組織によって組成やその種類は極めて多様性に富むことが知られている<sup>2)</sup>。

## 1-3 エラスチン (Elastin)

### 1-3-1 エラスチン

エラスチン (図 1-7) 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した後に残る、不溶性タンパク質として定義される<sup>3)</sup>。コラーゲンが組織に強度や張力を与えるのに対し、エラスチンは組織に伸縮性や弾性を与える繊維状タンパク質で、生体を構成する ECM の中で、コラーゲンに次いで多い<sup>4)</sup>。特に大動脈、靱帯、肺、皮膚などの伸縮性や弾性を伴う組織に多く見られ、その組織中の細胞 (主に線維芽細胞、平滑筋細胞、内皮細胞、軟骨細胞) によって前駆体であるトロポエラスチンとして産生される<sup>5)</sup>。細胞外へ産生されたトロポエラスチンは分子中に含まれるリシン側鎖に銅イオンとリシルオキシダーゼが働き、生体内架橋反応を経て不溶性のエラスチンとして形成される。架橋構造は、トロポエラスチン分子間の 4 つのリシン側鎖から導かれた 4 級ピリジニウム環を含むデスモシン、イソデスモシンと呼ばれる特徴的なもので、この架橋の存在により、エラスチンは弾性に富んでいる。また、生体内のエラスチンが不溶性となるのもこの架橋構造を有するためである<sup>3), 5)</sup>。

また、末梢神経においてもエラスチンは存在していることが確認され、周膜には一貫して存在し、上膜・内膜にも若干ながらも存在している<sup>6)</sup>。

MAGLTAAAPR PGVLLLLLSI LHPSRPGGVP GAIPGGVPGG 1-40  
 VFYPGAGLGA LGGGALGPGG KPLKPVPGGL AGAGLGAGLG 41-80  
 AFPAVTFFGA LVPGGVADAA AAYKAAKAGA GLGGVPGVGG 81-120  
 LGVSAGAVVP QPGAGVKPGK VPGVGLPGVY PGGVLPGARF 121-160  
 PGVGVLPGVV TGAGVKPKAP GVGGAFAAGIP GVGPFGGPQP 161-200  
 GVPLGYPIKA PKLPGGYGLP YTTGKLPYGY GPGGVAGAAG 201-240  
 KAGYPTGTGV GPQAAAAAAAA KAAAKFGAGA AGVLPGVGGA 241-280  
 GVPGVPGAIP GIGGIAGVGT PAAAAAAAAA AKAACYGAAA 281-320  
 GLVPGGPGFG PGVVGVPGAG VPGVGVPGAG IPVVPAGAGIP 321-360  
 GAAVPGVVSP EAAAKAAAKA AKYGARPGVG VGGIPTYGVG 361-400  
 AGGFPGFGVG VGGIPGVAGV PSVGGVPGVG GVPGVGISPE 401-440  
 AQAAAAAKAA KYGAAGAGVL GGLVPGPQAA VPGVPGTGGA 441-480  
 PGVGTPAAAA AKAAAKAAQF GLVPGVGVAP GVGVPAGVGV 481-520  
 APGVGLAPGV GVAPGVGVAP GVGVPAGIGP GGVAATAKSA 521-560  
 AKVAAKAQLR AAAGLGAGIP GLGVGVGVPG LGVGAGVPGL 561-600  
 GVGAGVPGFG AGADEGVRRS LSPELREGDP SSSQHLPSTP 601-640  
 SSPRVPGALA AKAACYGAA VPGVLGGLGA LGGVGIPGGV 641-680  
 VGAGPAAAAA AKAATAKAAQ FGLVGAAGLG GLGVGGGLGV 681-720  
 GVGGLGGIPP AATAKAAKYG AAGLGGVLGG AGGFPLGGVA 721-760  
 ARPGFGLSPI FPGGACLGKA CGRKRK 761-786

図 1-2 ヒトロポエラスチンのアミノ酸配列<sup>7)</sup>  
 (下線部がシグナル配列、27~786=760 残基が成熟タンパク)

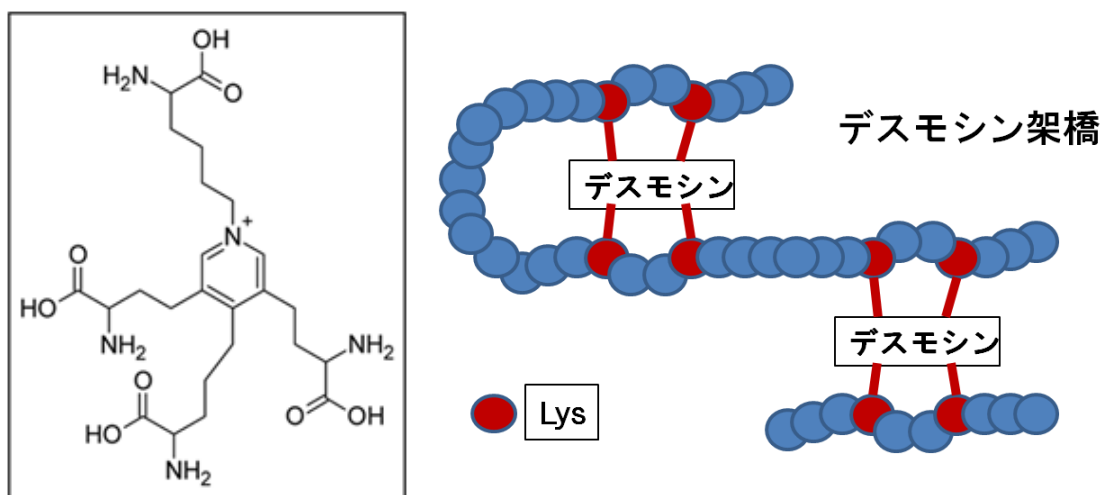


図 1-3 デスモシンの構造とエラスチンのデスモシン架橋

### 1-3-2 エラスチンヒドロゲル

エラスチンは、不溶性であるため、今まで材料としてあまり用いられなかった。しかし、シュウ酸処理等を行うことで、架橋構造の破壊、断片化することで水溶性にすることが可能になった。さらに、この水溶性エラスチンに架橋剤を加えることで、ある程度本来のエラスチンの構造を保ったまま再度架橋されるため弾性に富んだゲルができる。このゲル材料は、ゲル化時のエラスチンの濃度や架橋剤の濃度を変えることで弾性が変化することが判明している。

このようにエラスチンの特性を調査することで、組織工学における足場材料としての可能性を広めることができる。

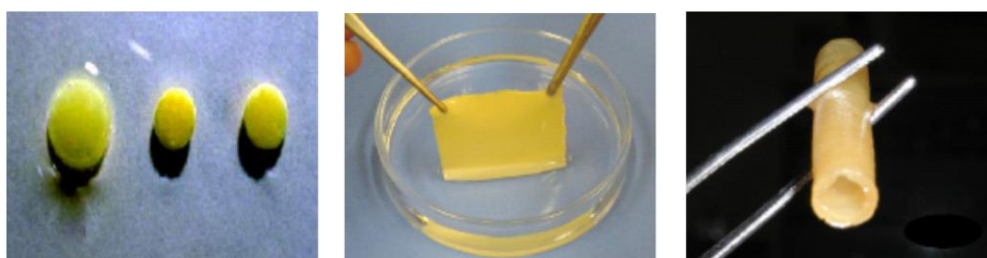


図 1-4 エラスチンヒドロゲルの作成例

また、今回の実験において、疎水性の架橋剤である Dode-DSP を用いた。Dode-DSP は、アミノ基 2 つをドデカンで架橋するように反応する。そのため、実験で用いる表記として、1 倍 mol ならエラスチンのアミノ基総数/2 が Dode-DSP の量となる。

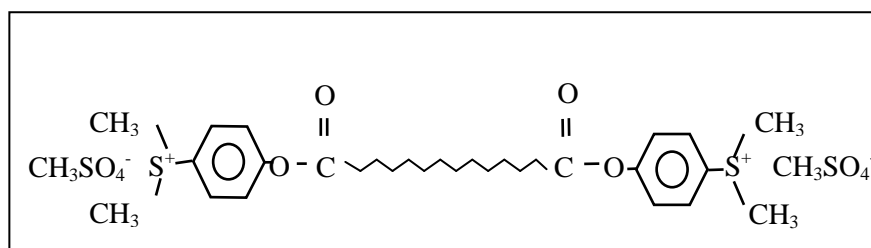


図 1-5 架橋剤 Dode-DSP の構造

## 1-4 末梢神経再生

### 1-4-1 人工神経

末梢神経は、損傷しても自己によって再生することができるが、損傷の程度が大きい場合再生することはできない。この場合の治療法として、以下のものが挙げられる。

#### 1. 外科縫合手術による治療法

損傷を受けた部分を直接縫合することで神経を再生させるものである。これは、損傷部のギャップが大きい場合用いることができず、また、縫合するだけのため回復が十分でない場合が多いという問題がある。

#### 2. 自家神経移植による治療法

損傷を受けた部分を患者本人の比較的重要でない神経を採取し、移植することで再生させるものである。これは、自己の神経に限りがあるため、量に限りがあるのと移植とは別に採取する手術が必要であるという問題がある。

以上の治療法は最良の治療とはいえない。そこで考えられたのが人工神経である。人工神経は、損傷部を接合管で連結させることで再生させるものである。しかし、ただ接続させるだけでは、うまく再生しないため、現在微小構造を持った人工神経などが研究されている<sup>8)</sup>。

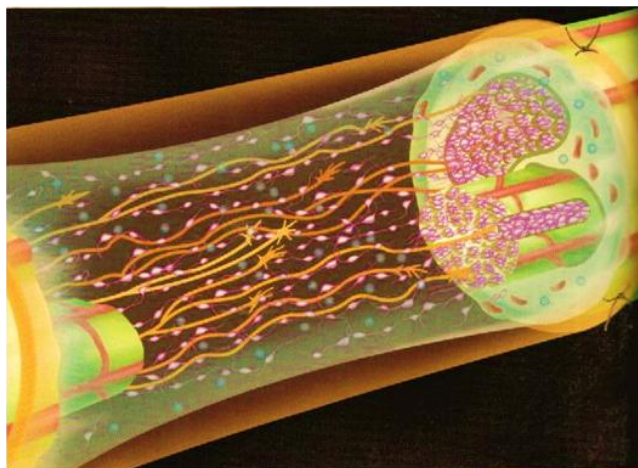


図 1-6 人工神経による末梢神経再生のイメージ<sup>9)</sup>



### 1-4-2 再生への戦略

末梢神経の再生への戦略として、人工神経管内を再生に適した環境を作ること考えた。再生に適した環境とは、末梢神経が本来自己の再生をするときに近い状態を作ることである。末梢神経再生のメカニズムは、本来末梢神経の周りに存在するシュワン細胞が神経成長因子等のサイトカインや足場となるタンパク質等を産生することで神経再生が行なわれる。このように細胞を用いた微小空間を作成することが再生に適した環境になる。

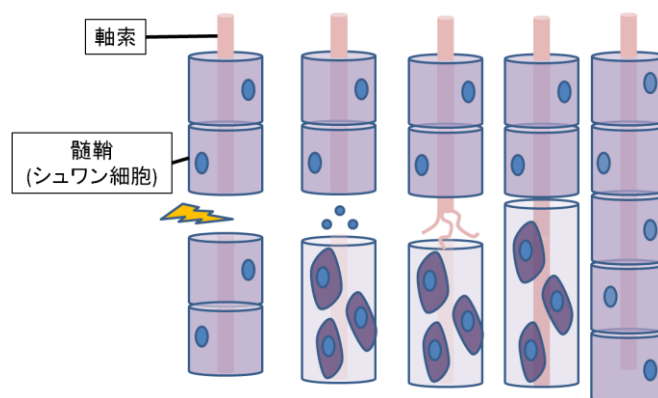


図 1-7 神経再生のメカニズム

以上から細胞源としてシュワン細胞が考えられる。しかし、シュワン細胞は、末梢神経の周辺にしか存在しないため、入手が困難であり、細胞源として使えない。そこで近年の研究により、骨髄から採取できる間葉系幹細胞(mesenchymal stem cell; MSC)からシュワン細胞に分化できるという報告がされている<sup>10),11),12)</sup>。これから細胞源としてMSCを用いることを考えた。

人工神経内を細胞で満たすことで再生を促すことが期待できる。そのために細胞懸濁液を人工神経内でゲル化させることを考えた。つまり、細胞包埋用ゲルの開発が必要になるが、こうした細胞包埋ゲルには、以下の問題点が考えられる。

- ・ゲル化の制御。
- ・細胞の分散化。
- ・細胞への栄養、酸素交換ができていないかわからない。(ゲルの内部構造)などが挙げられる。

本研究では、末梢神経再生材料のためにエラスチンを用いることを考えた。その理由として、①人工神経にエラスチンを材料にした研究がされていないためエラスチンと末梢神経再生への可能性を調査するため、②末梢神経には前述のようにエラスチンが存在しているからである。

## 1-5 本研究の目的

本研究の目的は、細胞包埋エラスチンゲルの開発である。

そのために以下の項目で実験を行った。

### ①エラスチンのゲル化

細胞包埋するため、37℃でのゲル化時間を評価した。

### ②エラスチンゲルの内部構造観察

エラスチンゲルの内部構造が細胞包埋ゲルとして適しているかを評価した。

## 2 方法

この章では、水溶性エラスチンの抽出、エラスチンのクラス分け、エラスチンのゲル化時間測定、エラスチンゲルの内部構造を見るための実験方法を述べる。詳細な実験手順は 8 章付録に掲載した。

### 2-1 水溶性エラスチンの抽出と分類

#### 2-1-1 水溶性エラスチンの抽出

三重県松阪食肉流通センターから頂いたブタ大動脈から中膜層以外の部分を除去し、細かくミンチにした後、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に対してシュウ酸による熱処理分解を行い、水溶化処理し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、上澄み液を凍結乾燥させることで水溶性エラスチンを得た。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-1 参照)

#### 2-1-2 水溶性エラスチンの分類(分画エラスチン)

抽出した水溶性エラスチンを凝集温度、ゲル弾性率によってクラス分けした。また、クラス分けした A-E の数平均分子量も調べた。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-1 参照)

### 2-2 エラスチンのゲル化時間測定

最終的にエラスチン濃度が 20,30,40%(w/w)になるように水溶性エラスチンを量り、脱イオン水または培地(DMEM)を加え、完全に溶けるまで混ぜた。次に、架橋剤 Dode-DSP を 0.5 倍量(対エラスチン NH 基)になるように加え、混ぜた。最後に促進剤の  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  を 40mM 加え、混ぜた後、37°C のインキュベータ内でゲル化させた。このゲル化を 10 分間隔で観察し、傾斜法でゲル化時間を評価した。

## 2-3 エラスチンゲルの内部構造観察

作成したエラスチンゲルを走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した。ゲルは、リン酸緩衝液(PB)で洗浄後、エタノールでの段階的脱水をし、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させた。その後、試料を割り、断片を観察できるようにセットし、真空イオン蒸着装置を用いて金イオンコーティング後、SEMで観察した。観察した SEM 画像を解析し、平均孔径や空隙率を算出した。

(※使用器具・試薬、操作法の詳細は付録 8-2 参照)

## 3 結果

### 3-1 水溶性エラスチンの分類

抽出したエラスチンは、表 3-1 のように凝集温度とゲル弾性率によってクラス分けをした。前の研究で調査されたクラス分けをしたそれぞれの数平均分子量も記した<sup>13)</sup>。また、このクラス分けしたエラスチンを基に 3-2 以降の実験で使用した。

表 3-1 エラスチンの凝集温度とゲル弾性率と数平均分子量

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(kPa)	50～	25～50	5～25	～5	×
数平均分子量(kDa)	25.2	21.4	18.7	10.3	10.1

### 3-2 エラスチンのゲル化時間測定

最終的にエラスチン濃度が 20,30,40%(w/w)になるようにエラスチンを量り、脱イオン水または培地で溶かした後、架橋剤 Dode-DSP0.5 倍 mol と促進剤  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 40mM を添加し、37℃でゲル化させた。10 分毎に傾斜法でゲル化を確認し、ゲル化時間をクラス毎に測定した。

#### 3-2-1 クラス別エラスチンのゲル化時間

本実験では、エラスチン A,B,D のゲル化時間を測定した。エラスチン C は、抽出量が少なかったため、またエラスチン E は、ゲル化しないため測定しなかった。

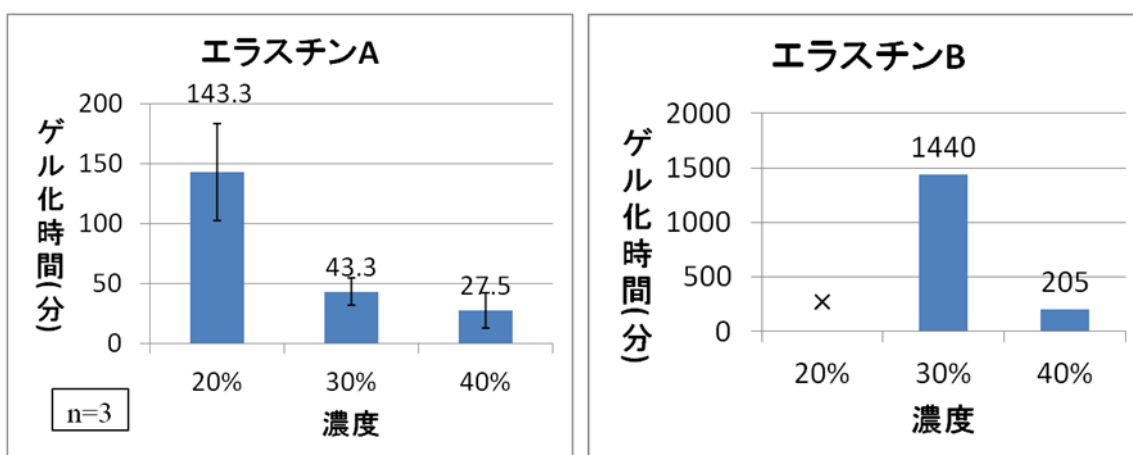


図 3-1 エラスチン A,B のゲル化時間

- ・エラスチン A は、どの濃度でもゲル化した。
- ・エラスチン B は、20%でゲル化しなかったが、30,40%でゲル化した。
- ・エラスチン D はゲル化しなかった。
- ・エラスチン A において、濃度が大きくなるにつれ 20%で 143 分、30%で 43.3 分、40%で 27.5 分とゲル化時間が短くなった。

### 3-2-2 混合エラスチンのゲル化時間

エラスチン A と B,D を混合させたときのゲル化時間を測定した。また、エラスチン A との混合比を変えて、ゲル化時間を測定した。

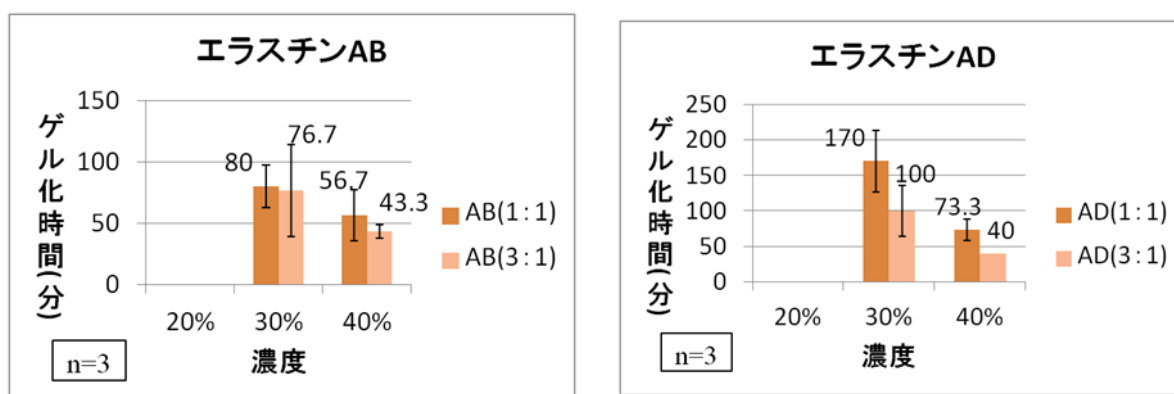


図 3-2 混合エラスチン AB,AD のゲル化時間

- ・単独ではゲル化しないエラスチン D でも、エラスチン A と混合することでゲル化した。
- ・各混合エラスチンの濃度において、混合比が(1:1)より(3:1)の方が、つまりエラスチン A の濃度が大きいほどゲル化時間が短くなった。

### 3-2-3 混合エラスチン AE のゲル化時間

上の結果から、単独ではゲル化しなかったエラスチン D がエラスチン A と混合させることでゲル化したため、本来ゲル化しないエラスチン E とエラスチン A を混合させたときのゲル化時間を測定した。また細胞包埋を想定して、培地(DMEM)を用いたゲル化時間を測定した。また、エラスチン A と E の混合比の違いも測定した。

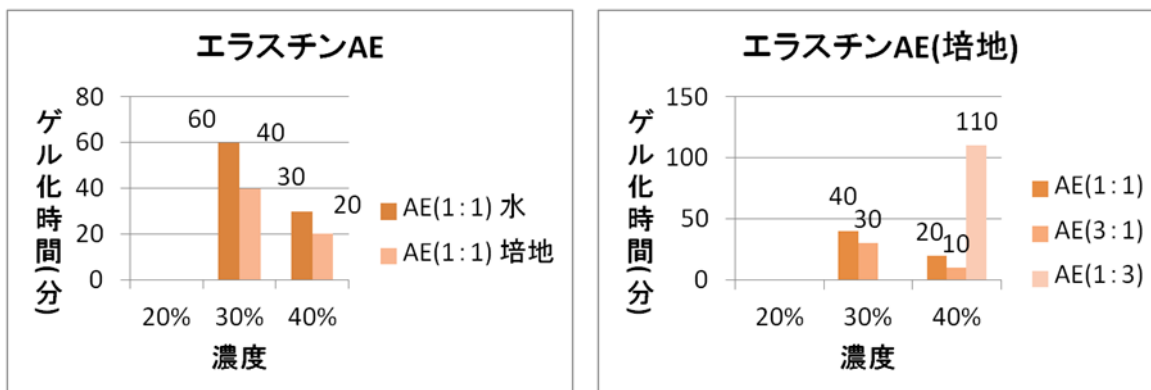


図 3-3 混合エラスチン AE のゲル化時間

- ・本来ゲル化しないエラスチン E が A と混合することでゲル化した。
- ・脱イオン水より培地で行った方が、ゲル化時間が短くなった。
- ・エラスチン A の濃度が大きくなるほど、ゲル化時間が短くなった。
- ・溶液脱イオン水で混合比(1:1)において、エラスチン AE が 30%で 60 分、40%で 30 分に対してエラスチン AB,AD がそれぞれ 30%で 80,170 分、40%で 56.7,73.3 分であることからゲル化時間が短い傾向が見られた。

### 3-3 エラスチンゲルの内部構造観察

最終的にエラスチン濃度が 20,30,40%(w/w)になるようにエラスチンを量り、脱イオン水または培地に溶かした後、架橋剤 Dode-DSP0.5 倍 mol と促進剤  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 40mM を添加し、37℃でゲル化させた。その作成したゲルの内部構造を SEM で観察した。撮影した SEM 画像の一部を示した。

#### 3-3-1 各クラスのエラスチンゲルの内部構造

単独でゲル化したエラスチン A の 20,30,40%とエラスチン B の 40%のゲルの内部構造を観察した。エラスチン B の 30%は、ゲルの強度が弱く、形状を維持できなかったため観察できなかった。

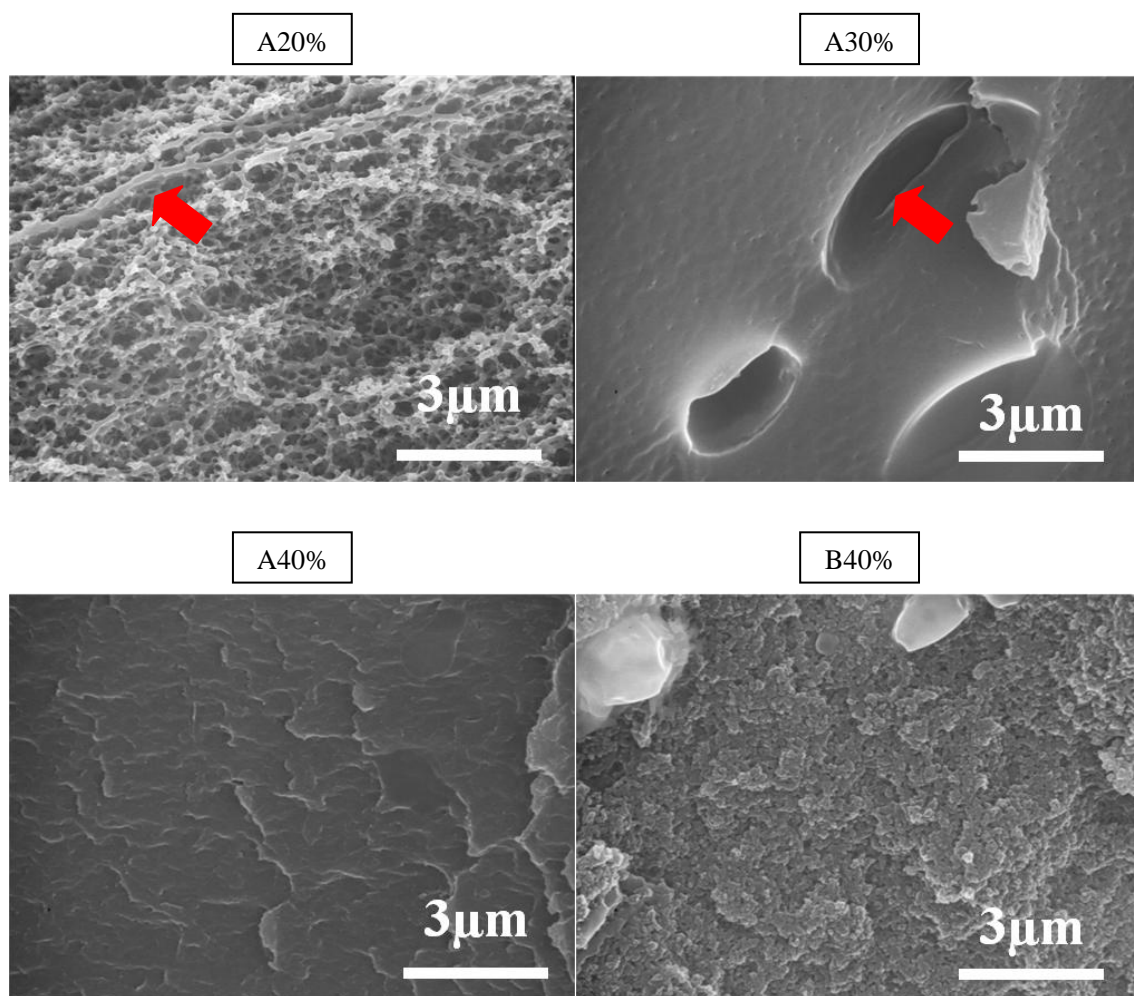


図 3-4 各クラスのエラスチンゲルの内部構造

- エラスチン A の 20% では、全体的に線維が見られた。
- エラスチン A の 30% では、孔径(穴)が見られたが、密な構造をしていた。
- エラスチン A の 40% とエラスチン B の 40% では、密な構造をしていた。



### 3-3-2 混合エラスチンゲルの内部構造

ゲル化した混合エラスチン AB,AD,AE(割合はすべて 1:1)の 30,40%のゲルの内部構造を観察した。

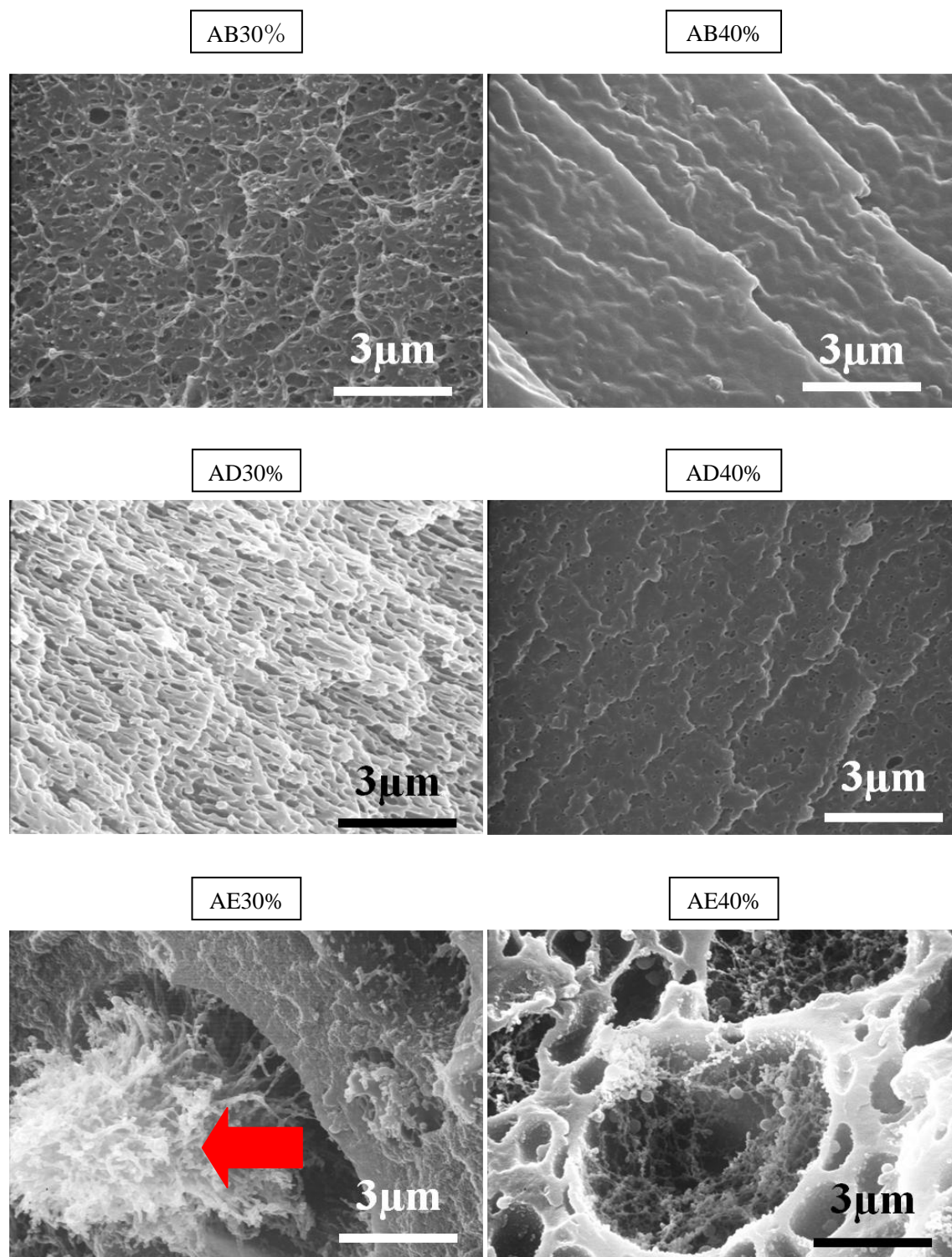


図 3-5 混合エラスチン AB,AD,AE(1:1)のゲルの内部構造

- ・エラスチン AB,AD30%では、小さな孔径が見られた。
- ・エラスチン AB,AD40%では、密な構造が見られた。
- ・エラスチン AE30%では、孔径の中に線維の塊が見られた。
- ・エラスチン AE40%では、空隙が多く見られた。

以上の単独と混合のエラスチンゲルの平均孔径と空隙率(孔径の割合)は、以下の通りであった。

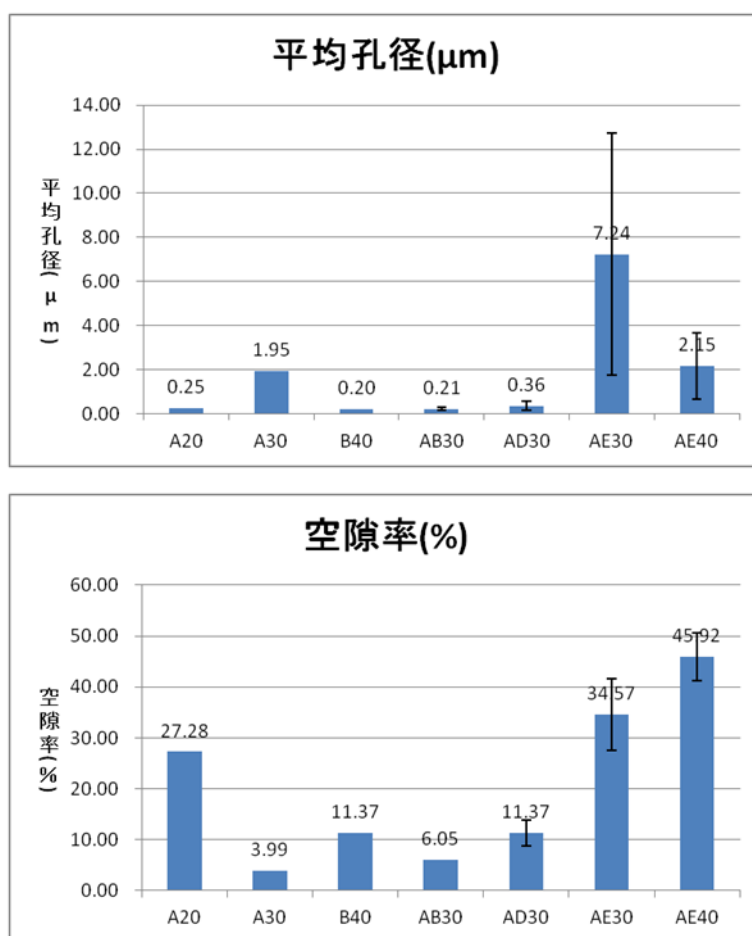
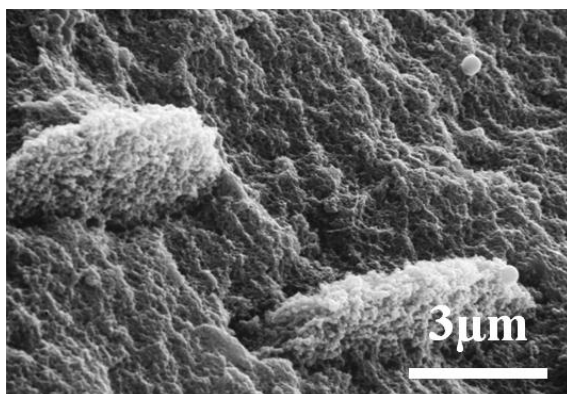


図 3-6 エラスチンゲルの内部構造の平均孔径と空隙率

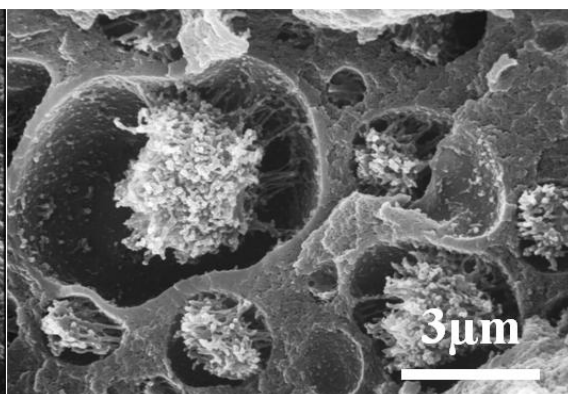
- ・エラスチン AE30,40%の平均孔径が 7.24、2.15μm で、空隙率が 34.57、45.92%であり、他の平均孔径(約 0.2μm)や空隙率(約 10%)と比べて大きいことがわかった。

次に溶液を脱イオン水ではなく、培地(DMEM)でゲル化させた混合エラスチンゲルの内部構造を観察した。また、混合比(A:E)を(3:1)(1:1)での違いを比較した。

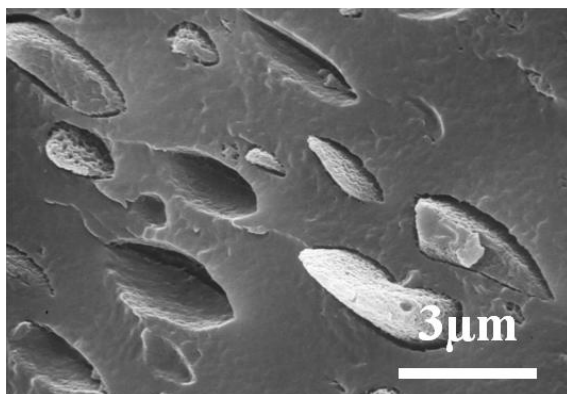
AE30%(3:1)培地



AE30%(1:1)培地



AE40%(3:1)培地



AE40%(1:1)培地

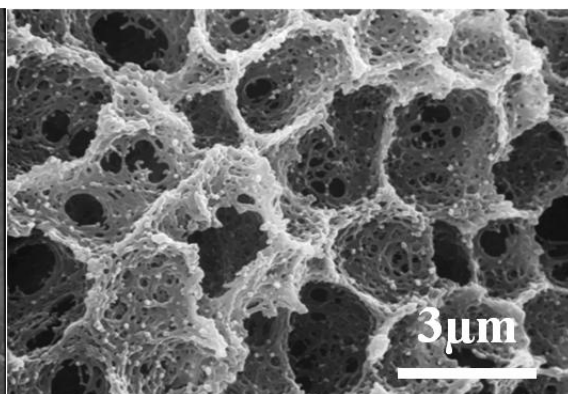


図 3-7 培地での混合エラスチン AE の内部構造

- 混合比(3:1)では、30,40%とも孔径と線維の塊が見られたが、密な構造をしていた。
- 混合比(1:1)では、溶液が脱イオン水ときと同様に 30%では孔径内に線維の塊が見られ、40%では空隙が多く見られた。

これらの平均孔径と空隙率は、以下の通りであった。

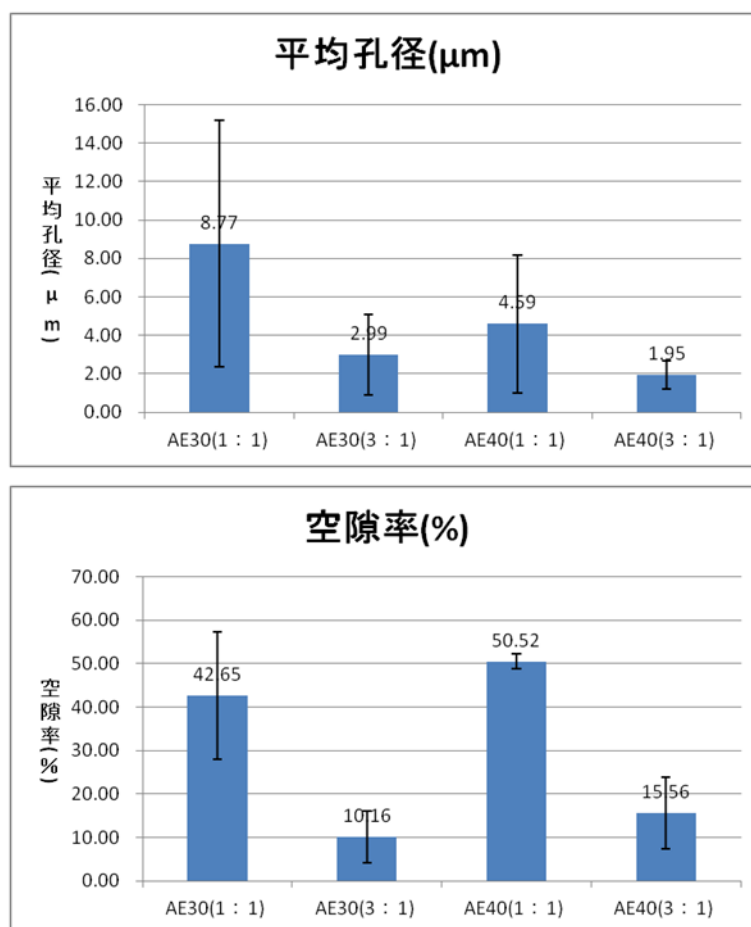


図 3-8 混合エラスチンゲル AE の平均孔径と空隙率

- ・エラスチン AE の 30、40%とも混合比(1:1)の方が平均孔径 8.77、4.59μm と空隙率 42.65、50.52%であり、混合比(3:1)では、平均孔径が 2.99、1.95μm 空隙率が 10.16、15.56%であったため、混合比(1:1)の方が平均孔径と空隙率が大きいことがわかった。
- ・AE30,40%(1:1)において、脱イオン水と培地に違いはなかった。



## 4 考察

### 4-1 エラスチンのゲル化

一般的にゲル化するには、エラスチン分子内や分子間での相互作用によって引き寄せられることや、また架橋されることで高分子となり、それが網目構造をとることで起こる。そのため、エラスチンがゲル化するにはいかに高分子となるかが重要である。そこで本実験においては、架橋剤を用いているためどのように架橋するのかを考えることで、エラスチンのゲル化を考察した。

本研究では、凝集温度とゲル弾性率によってクラス分けした水溶性エラスチンを用いた(表 3-1)。また、架橋剤に Dode-DSP を用いた。この架橋剤は、2 つのアミノ基間で架橋する。そのため、エラスチンの架橋部位として N 末端とアミノ基を有するアミノ酸残基が考えられる。図 4-1 と表 4-1 でブタトロポエラスチンのアミノ酸組成と配列を示し、アミノ基を持つアミノ酸をオレンジで示し、デスモシン架橋されている可能性のあるリシン残基を下線部で示した。また、過去の研究より、各クラスのアミノ酸組成とデスモシンの含有比が調べられている(表 4-2、図 4-2)。以上のことから、エラスチン A-E には、デスモシン架橋が残ったまま存在していることが考えられる。そのため、架橋部位になりうるアミノ酸残基が少ない(5 個)と考えられ、またデスモシン架橋が残っていることから図のように N 末端がエラスチン 1 分子に多数あることが考えられる(図 4-3)。このように N 末端が架橋部位であると考ええると、エラスチン A はエラスチン E に対してデスモシン含有量の約 3 倍であることから、架橋部位も 3 倍あることになる。そのため、エラスチン A は、ゲル化しやすいと考えられる。

また、別に分子量がゲル化に影響している可能性も考えられる。エラスチン A は、分子量が一番大きいため、他のクラスのエラスチンと比べて架橋が少なくとも高分子化になる。そのため、エラスチン A は、ゲル化しやすいと考えられる。

濃度においては、濃くなるほど密な状態になるため、濃度が薄いときと比べて架橋部位が近くなり、架橋反応がしやすい状態になっていると考えられる。また、濃度が大きくなるとその分エラスチン量や架橋剤量も増えるため、より速くゲル化すると考えられる。

GGVPGAVPGG VPGGVFFPGA GLGGLG (←	40
27から88に、6P, 22G, 18A, 4V, 7L, 2F, 1D, 1Kが含まれる	80
→)KA AKAGAGLGGV GGVGGLGVST GAVVPQLGAG	120
PGAGA KAPGK VPGVGLPGVY PGTVLPGTGA RFPGVGVLP	160
VPTGTGV KAP GGGGAFAGIA GVGPFGGQQP GVPLGYPI KA	200
PGKLPYGFPG GVAGAAG KAG YPTGTGVGTE AAAAAAAAA KA	240
AAKYGAPGAG VLPGVGVGGV GVPGGAGAI V GIGGIAGAGA	280
VAAAVAAA KA AKYGAAGGLV PGAPGFGPGV GVPGVGVPGV	320
GVPGVGVPGV SVPGVGVPGV GVPGVGVPGV GVPGVGVPGV	360
GVPGAV×PAA AAKAAAKAAK YGARGGVGVG GIPTFGVGAG	400
GFPFGVGVG GVPGAALSPA GAVPGPLAAG GAAAA KA AK	440
LGAAGAGALG GLVGAEGAV PGVPGAGAVP GVGAPAAAA	480
KAAAKAAQFG LGPGIGVAPG VGVAPGVGVA PGVGVAPGVG	520
VAPGIGIGPG GVIGAGAPAA AKSAKAAKA EFEEAAGLPA	560
GVPFGVGAG VPGFGVGAGV PGFGAGAVVG PLAAA KAAKY	600
GAAGaALGGVG DLGGAGIPGG VAGVGPAAKA AAKAAQFGVG	640
GVGGLGVGGL GAVPGAGAFG GVAPAAA KAA K	680

図 4-1 ブタトロポエラスチンのアミノ酸配列<sup>14)</sup>

表 4-1 ブタトロポエラスチンのアミノ酸組成

G	A	V	P	L	I	C	M	W	F
214	162	95	74	31	11	0	0	0	19
Y	H	K	R	D	E	T	S	N	Q
8	0	29	2	2	4	9	4	0	5

表 4-2 各クラスのエラスチンのデスモシン含有量<sup>13)</sup>

	エラスチン A	エラスチン C	エラスチン E
デスモシン(mol%)	2.87	2.53	0.94

	A	C	D	E
G	32.6	33.7	33.0	31.4
A	28.8	26.0	27.2	18.4
V	12.8	15.1	14.7	13.8
P	4.3	4.8	4.8	5.7
F	3.3	3.3	3.1	3.2
L	6.4	6.1	6.0	6.0
I	1.7	1.8	1.7	2.3
S	1.4	1.2	1.3	2.4
T	1.7	1.5	1.5	2.3
Y	2.6	1.8	2.0	1.5
K	0.7	0.8	0.8	2.3
R	0.6	0.6	0.6	1.8
DN	0.3	0.6	0.5	2.6
EQ	2.6	2.4	2.5	5.1
H	0.2	0.3	0.3	1.0
C	0.0	0.0	0.0	0.0
M	0.0	0.0	0.0	0.3
HyP	0.0	0.0	0.0	0.0

図 4-2 各クラスのエラスチンのアミノ酸残基組成比(横＝クラス、縦＝アミノ酸残基)<sup>13)</sup>

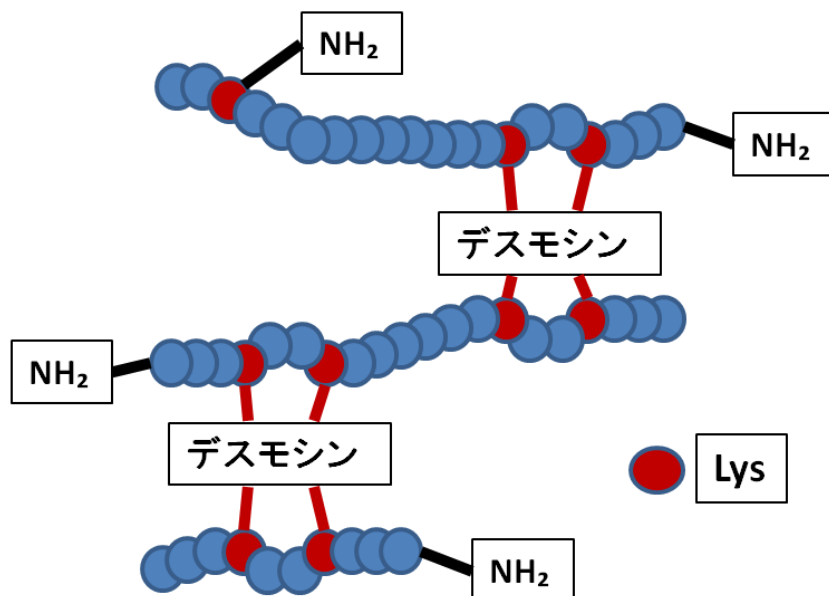


図 4-3 考えられるデスモシン架橋が残ったエラスチン A の構造

## 4-2 混合エラスチンゲル

本研究では、ゲル化しやすいエラスチン A と他のクラスのエラスチンとを混合させることで、どういった現象が起こるかを調査した。その結果、単独でゲル化しなかったエラスチン D でも、エラスチン A と混合させることでゲル化することがわかった。これは、エラスチン A のゲル化のしやすさの寄与によるものだと考えられる。しかし、興味深いことに通常ゲル化しない(ゲル弾性率の条件である架橋倍率が 2 倍 mol で、加熱処理をしてもゲル化しない)エラスチン E でもエラスチン A と混合することでゲル化することがわかり、且つ混合エラスチン AB, AD の同条件において、ゲル化時間が短い傾向が見られた。これは、ゲルの内部構造で孔径内に線維の塊が見られることから、エラスチン A と E とで溶液内での相分離が生じたことが考えられる。特に図 3-7 でのエラスチン A と E の混合比を(3:1)にしたゲルつまり、エラスチン A が多い状態においても顕著に見られた(図 4-4)。相分離を起こした混合エラスチン AE では、それぞれエラスチン A は A 同士、エラスチン E は E 同士近づいた状態になったため、エラスチン A 同士近づいた状態のところでは、局所的にエラスチン A の濃度が大きくなり、ゲル化が促進されゲル化時間が短くなったと考えられる。

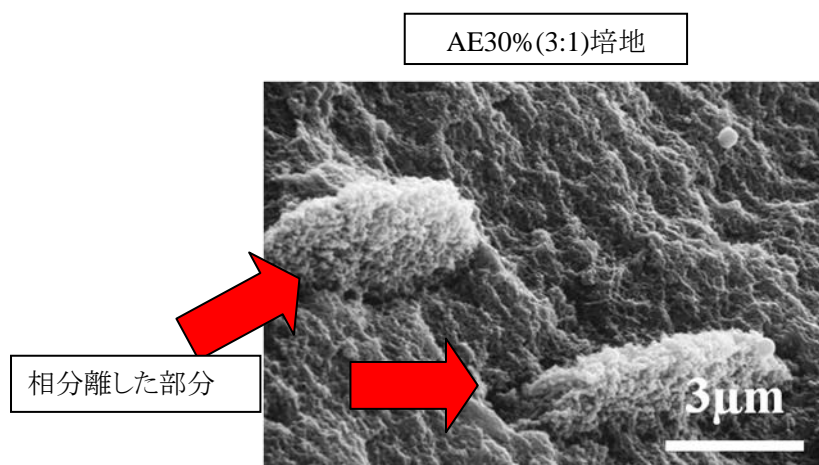


図 4-4 混合エラスチン AE30(3:1)での相分離

また、この混合エラスチンゲル AE の混合比(1:1)の 30、40%においてそれぞれ平均孔径が 8.77、4.59 $\mu\text{m}$  であり、空隙率が 42.65、50.52%から細胞包埋を考えたとき、細胞遊走や栄養の供給などの細胞活動に適した環境であるように思われる。特に末梢神経再生を狙った人工神経管内での細胞包埋ゲルにおいては、細胞包埋された部分から再生を促すサイトカインが生成され、神経再生を促すことを考えたとき、この空隙率の大きさがサイトカインの徐放に役立ち、且つ末梢神経の大きさが約 0.3~22 $\mu\text{m}$  であることからこの孔径のサイズが小さい神経の進路になる可能性が考えられる。



### 4-3 エラスチン A と E の関係性について

エラスチン A と E の組み合わせでのみ相分離が見られた。この点について考察する。まず、凝集温度が関係していることが考えられる。表 3-1 で見られたように、エラスチン E の凝集温度は、35~50℃である。一方エラスチン A は、25℃以下である。このことからエラスチン A になるほど凝集しやすいがわかる。今回 37℃でゲル化させたため、エラスチン E だけが凝集しなかったため、相分離が起こったと考えられる。図 4-5 のようにエラスチン A は、凝集してゲル化を始めるのに対して、エラスチン E では、凝集しないためエラスチン A と一見別々の相を作ると考えられる。そのためエラスチン A と E だけが相分離したと考えられる。

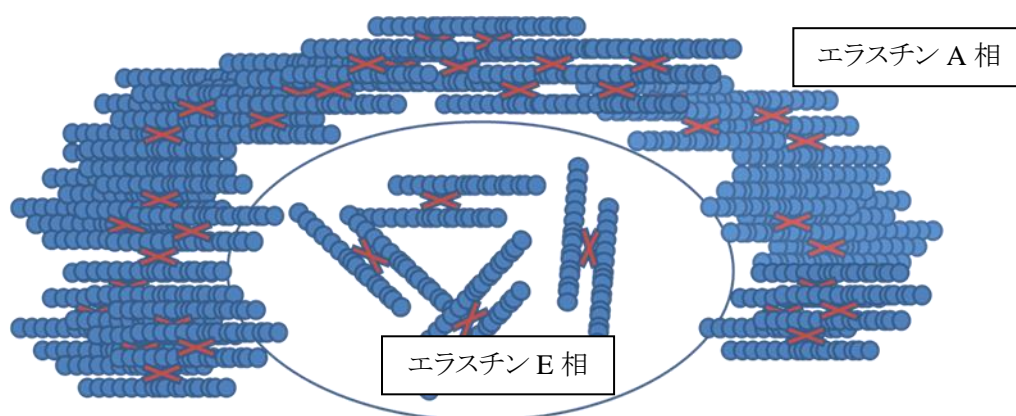


図 4-5 エラスチン A と E の相分離

また、先に述べたようにエラスチン E の架橋部位が少ない可能性が考えられる。そのため、エラスチン E と架橋した場所がそこで架橋が止まり、一方エラスチン A の方では、架橋が進みゲル化し、結果として架橋が止まったエラスチン E の部分が線維の塊のようになったのではないかと考えた。

## 5 結論

今回の研究によって

1. エラスチン E がエラスチン A と混合させることでゲル化することがわかった。
2. 混合エラスチンゲル AE が AB,AD とは違い特異的にゲル化することがわかった。
3. 混合エラスチンゲル AE の内部構造は、孔径が大きく、空隙率が高いことがわかった。

以上のことから混合エラスチンゲル AE が細胞包埋ゲルに適している可能性が示唆された。

今後、実際に細胞包埋していくことで細胞への応答(生存等)を確認し、将来的には、末梢神経再生を促す人工神経管内の環境づくりなどに応用できると考えられる。

## 6 参考文献

- 1) 新海宏、:「知」の世界へどうぞ 第2集/千葉大学
- 2) Zhao Y.H.,et al: Expression of Osterix in mechanical stress-induced osteogenic differentiation of periodontal ligament cells in vitro. *Eur J Oral Sci* 2008;116: 199-206
- 3) 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, 2006
- 4) 木南凌、ほか: 細胞の世界. 西村書店, 2005
- 5) Daamen W. F.,et al: Elastin as a biomaterial for tissue engineering. *Biomaterials*.2007; 28: 4378-98
- 6) Tassler PL.et al: Identification of elastic fibres in the peripheral nerve. *J Hand Surg Br*. 1994 Feb;19(1):48-54.
- 7) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/P15502>
- 8) Ahmet B.et al: In vitro cell alignment obtained with a Schwann cell enriched microstructured nerve guide with longitudinal guidance channels  
*Biomaterials*. 2009 Jan;30(2):169-79
- 9) 日本人工臓器学会編: 人工臓器イラストレイテッド.2007
- 10) Brohlin,M.et al:Characterisation of human mesenchymal stem cells following differentiation into Schwann cell-like cells. *Neurosci Res*.2009;64:41-49
- 11) Shimizu,S.et al:Peripheral nerve regeneration by the in vitro differentiated -human bone marrow stromal cells with Schwann cell property. *Biochem Biophys Res Commun*.2007;359:915-20
- 12) Dezawa M.et al: Sciatic nerve regeneration in rats induced by transplantation of in vitro differentiated bone-marrow stromal cells. *Eur. J. Neurosci*.2001;14:1771-1776
- 13) 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,2007
- 14) Z Indik. et al:Alternative splicing of human elastin mRNA indicated by sequence analysis of cloned genomic and complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 Aug;84(16):5680-4.

## 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に関して多くの助言を頂き、また私生活においても心温かく見守り、様々な心温かいお言葉を頂いて、本当に助かりました。本当に有難う御座いました。

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的富田昌弘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」グループである水谷 直紀先輩、熊澤 雄基君、神谷 歩君、境 淳史君、中村 雅弘君、影山 聡志君、財部 龍太郎君、長谷川 まりなさん、本当に有難う御座いました。特に、直属の先輩として4年のときからお世話になっている水谷 直紀先輩には実験のサポートや、研究内容に関する多くの貴重な意見を頂き、また研究生活のアドバイスも頂きました。心の底から感謝致します。

研究面だけでなく、生活面でも支えて頂いた、大友 佳子さん、加藤 真司君、野口 寛之君、東 洋君、堀井 貴司君、山本 光則君、本当にありがとうございました。

最後に研究室生活において様々な形でサポートして頂いた村上 節子さん、そして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 24 年 2 月  
佐々木 剛

## 8 付録

### 8-1 水溶性エラスチンの抽出と分類

#### 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抽出

### [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。

### 8-1-3 水溶性エラスチンのクラス分け

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クラス分けを行う。

表 8-1 エラスチン溶液の凝集温度によるクラス分け

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）

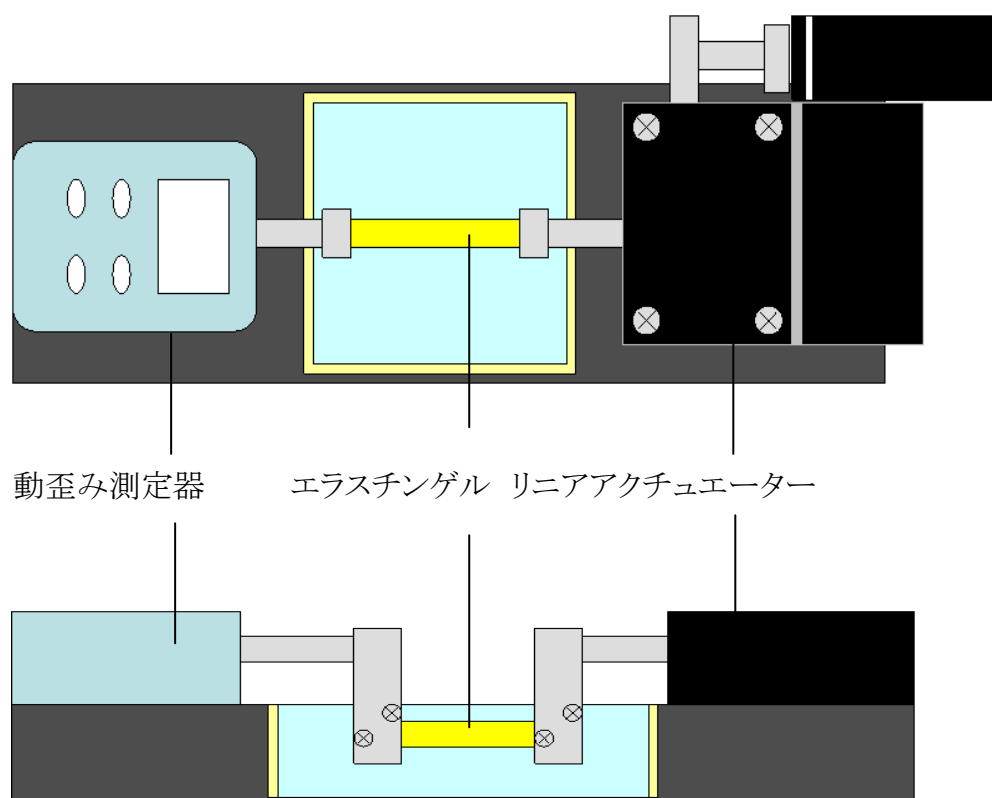


図 8-1 弾性率測定装置



[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  $F$  (N) で引き伸ばし、物体の長さが  $I_0$  (m) から  $I$  (m) へと変形した時、その時の応力  $\sigma$  (Pa) と歪  $\gamma$  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  $E$  (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パーサーを付け、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クラス分けする。

表 8-2 エラスチンゲルの凝弾性率によるクラス分け

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クラス分け

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)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Wako, Lot No.KCG5195, Cat No.197-02865)
- 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]

エラスチンゲルの場合(②の脱水法は、文献と研究室従来の間の方法である)

- ① 試料を 0.1 M リン酸緩衝液 pH7.4 で 10 分×2 回洗浄した。
- ② 50, 70, 80, 90, 95, 99 % エタノール/脱イオン水で 10 分ずつ段階的に脱水した。
- ③ 37℃、50 % t-ブチルアルコール/エタノールで 15 分置換した。
- ④ 37℃、100 % t-ブチルアルコールで 30 分×2 回置換した。
- ⑤ 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。

#### 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℃になるまで待った。
- ③ 4℃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、押さえ蓋を置いた。
- 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。
- 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)。



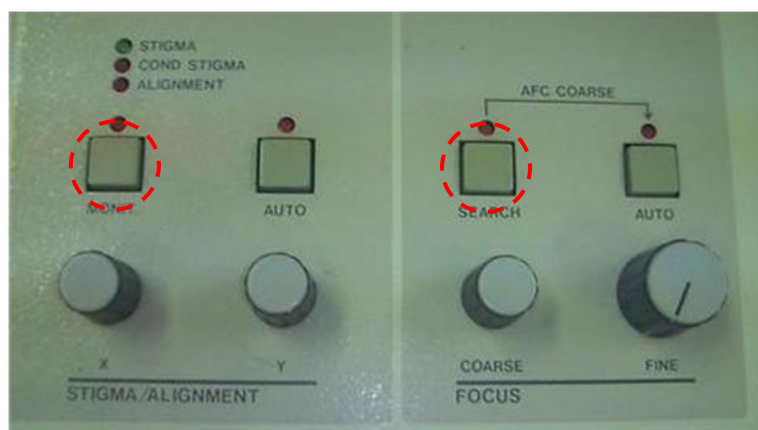


図 8-7 ピントの調整

(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)。

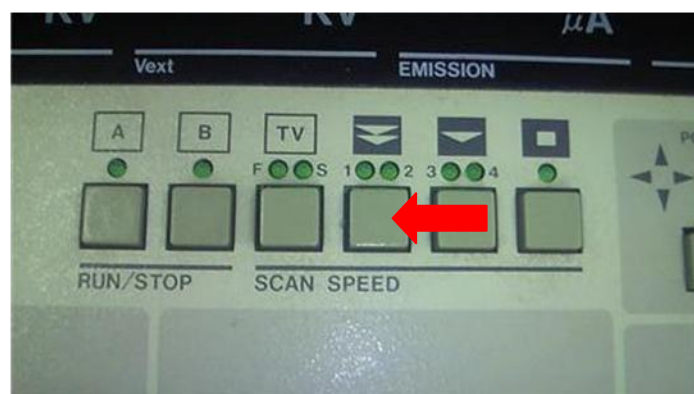


図 8-8 SCAN SPEED の調節

(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。



### 8-2-3 SEM 画像解析法

SEM を用いて撮影した画像から構造パラメータを解析した方法を記述する。

#### 平均孔径の算出法

- ① Image J を起動させた。
- ② [File]→[open]と開き、解析したい画像を選択した。
- ③ ツールバーから直線ツール(Straight line selections)を選択し、スケールバーの長さと等しい直線を引いた。
- ④ [Analyze]→[Set Scale]を選択し、Known Distance の欄にスケールバーの既知の長さを入力し、Unit of Length にその単位を入力した。
- ⑤ 無作為に孔径を直線ツール(Straight line selections) で選択し、[Analyze] → [Measure]をクリックした。すると別窓が開き、そこに選択した孔径の値が表示された。
- ⑥ それを 50 個分の孔径を測定した。(50 個もない場合はあるだけ測定した。)
- ⑦ 得られたデータを Excel にコピー & ペーストした。
- ⑧ 平均孔径を算出した。

#### 空隙率の算出法

- ① ペイントを起動させた。
- ② カラーボックスから右クリックで黒を選択した。
- ③ ツールバーの自由選択で孔を囲み、枠線上で右クリックし、[切り取り]を選択した(囲んだ範囲が黒抜きになる)。
- ④ ③を全ての孔に対して行った。
- ⑤ 孔を全て黒抜きにした画像の名前を変えて保存し、Adobe Photoshop 7.0 を起動させた。
- ⑥ [ファイル]→[開く]から先ほど加工した画像を選択した。
- ⑦ [イメージ]→[色調補正]→[2 階調化]を選択し、孔以外がすべて消えるように閾値を選択した。
- ⑧ [イメージ]→[ヒストグラム]を選択し、黒のピクセルの比率を読み取った。