

平成 23 年度 修士論文

軟骨細胞の
硫酸化ネイティブジェラン含有
三次元足場培養に関する基礎研究

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
野口寛之

目次

1. 緒言

1-1 変形性関節症・・・・・・・・・・・・・・・・・・1

1-1-1 膝関節の構造

1-1-2 変形性膝関節症

1-1-3 現行の変形性膝関節症治療とその問題点

1-2 再生医療と組織工学

1-2-1 組織工学

1-2-2 軟骨とその構造

1-2-3 関節軟骨再生用材料

1-3 グリコサミノグリカン

1-3-1 グリコサミノグリカンとは

1-3-2 グリコサミノグリカンの主な働き

1-4 ジェランガム

1-4-1 ネイティブジェランと脱アシル型ジェラン

1-4-2 硫酸化ネイティブジェラン

1-4-3 カルボキシメチルジェラン

1-5 目的

1-5-1 目的

1-5-2 実験項目

2. 方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・14

2-1 二次元培養基材の作製

2-1-1 G.S コーティングシャーレの作製

2-1-2 接触角測定

2-1-3 ESCA による表面分析

2-2 GS の作用評価

2-2-1 細胞の培養と継代

2-2-2 細胞増殖試験

2-2-3 GS 添加による形態変化調査

2-2-4 表面抗原解析による表現型調査

2-3 三次元培養担体の作製とその評価

2-3-1 CMG の調製

2-3-2 CMG ゲルの作製

2-3-3 GS-CMG ゲルの作製

2-3-4 弾性率測定

2-3-5 膨潤率測定

2-3-6 ゲル化時間測定

2-3-7 SEM 撮影

3. 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・18

3-1 コーティングの評価

3-1-1 接触角測定

3-1-2 ESCA による表面分析

3-2 GS の作用評価

3-2-1 細胞増殖試験

3-2-2 GS 添加による形態変化調査

3-2-3 表面抗原解析による表現型調査

3-3 培養担体の評価

3-3-1 弾性率測定

3-3-2 膨潤率測定

3-3-3 ゲル化時間測定

3-3-4 SEM 撮影

4. 考察	31
4-1 二次元培養基材の評価	
4-1-1 GS の固定化状態	
4-2 GS の作用について	
4-2-1 表現型について	
4-2-1-1 軟骨細胞の表現型	
4-2-1-2 GS と細胞表現型の関係性	
4-2-2 細胞増殖について	
4-3 三次元培養担体の評価	
4-3-1 弾性率について	
4-3-2 膨潤率について	
4-3-3 ゲル化時間について	
4-3-4 ゲル微細構造について	
5. 結論	42
6. 謝辞	43
7. 参考文献	44
8. 付録	46
8-1 培地、試薬の調製	
8-1-1 培地調製	
8-1-2 各溶液の調製	
8-2 細胞培養	
8-2-1 細胞の解凍	
8-2-2 培地交換	
8-2-3 継代培養	

8-3 GS コーティングシャーレの作製

8-3-1 GS 溶液、NG 溶液の調製

8-3-2 細胞培養用コーティングシャーレの作製

8-3-3 接触角測定用コーティングシャーレの作製

8-4 接触角測定

8-5 細胞増殖試験

8-6 GS 添加による形態変化調査

8-7 Flow Cytometry 解析

8-7-1 解析準備

8-8 三次元培養担体の作製

8-8-1 CMG の調製

8-8-2 CMG ゲル、GS-CMG ゲルの作製

8-9 物性評価

8-9-1 弾性率測定

8-9-2 膨潤率測定

8-9-3 ゲル化時間測定

8-10 ESCA

8-10-1 ESCA の使用方法

8-11 SEM

8-11-1 SEM 用サンプル準備

8-11-2 SEM 関連機材の使用方法

1. 緒言

1-1 変形性関節症

変形性関節症(Osteoarthritis)とは、関節を形成する軟骨が何らかの原因で変形し、機能的な障害や痛みを起こした病態である。

正常な関節では、筋肉・腱・靱帯などが関節への負担を適切に分散し、関節に直接衝撃が加わらない仕組みになっている。しかし、変形性関節症では加齢や過度の関節運動などによって分散の仕組みが正常に機能せず、軟骨に過度な負担がかかり、軟骨の磨耗、消失、骨変形へと繋がっていく^[1]。

本章では膝における変形性関節症、変形性膝関節症について述べる。

1-1-1 膝関節の構造

膝は歩く、走る、座るといった日常の動作の際に、屈伸・ねじれ・回転といった複雑な動きを行っている。膝がこのような動きを滑らかに行うことが出来るのは、関節表面に関節軟骨が在るためである。関節軟骨は弾力性に富み滑らかな表面をしているため、どんな動きにも滑らかに対応できる^[1, 2]。

しかし、関節軟骨のみで膝の動きに対応しているわけではなく、膝関節の複雑な構造によって上述のような膝の動きは成り立っている。

膝関節の構造を Fig.1-1 に示す。

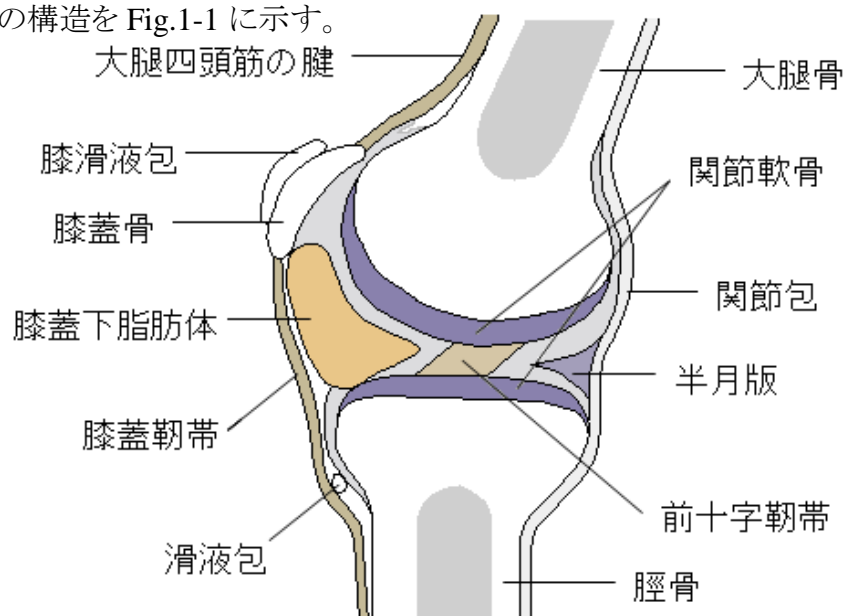


Fig.1-1 膝関節の構造(右足内側)

「軟骨」は大腿骨と脛骨の表面部分を厚さ 4mm 程度で覆っており、直接体重を支えている。「半月板」は軟骨が接する部分の間に三日月のような形で挟まっており、

ショックを吸収して関節を安定させている。「靱帯」は左右の側方向の安定を受け持つ側副靱帯と、前後方向とひねり運動時の安定を受け持つ十字靱帯があり、膝を支持・安定させている。「関節包」は関節を覆っており、この内側に存在する「滑膜」は関節の潤滑油として働く「滑液」の産生と異物の取り込みを行い、軟骨を保護している。

1-1-2 変形性膝関節症

変形性膝関節症は、長年にわたる膝の酷使、加齢による筋肉の衰え、慢性的・複合的な負荷などによって、膝の関節軟骨が磨耗・損傷していくことで生じる病態である。

厚生労働省では国内での変形性膝関節症患者数を、自覚症状を有する患者は約 1000 万人、潜在的な患者(X 線診断による患者数)は約 3000 万人と推定しており^[3]、社会の高齢化が進む中、患者数は年々増加していくと予想される。

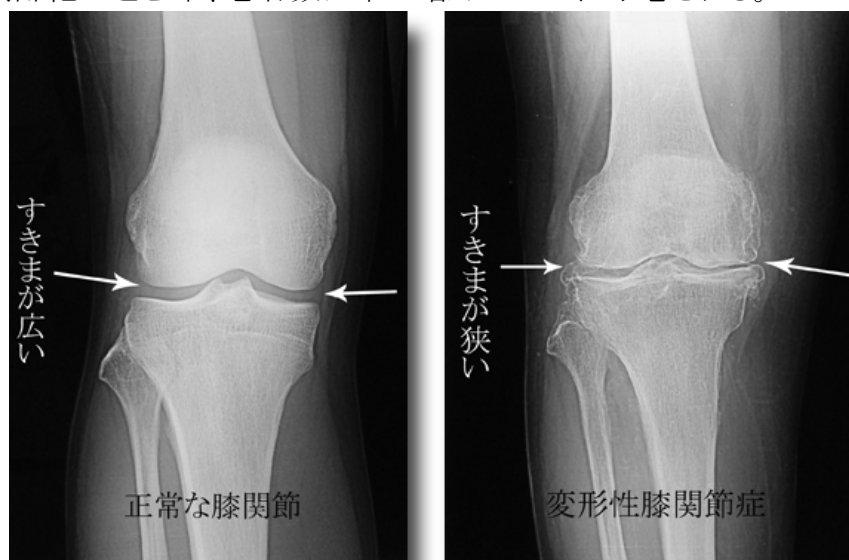


Fig.1-2 正常な膝関節(左)と変形性膝関節症(右)の X 線写真^[4]

正常な膝関節の X 線写真では関節表面に軟骨が存在するため、関節の間の隙間が広く写されている (Fig.1-2 左写真)。

対して、変形性膝関節症の X 線写真では軟骨がすり減り、関節の間の隙間が狭くなっている。また、大腿骨と脛骨の関節部分において骨の変形が見られる (Fig.1-2 右写真)。

これらの特徴より、変形性膝関節症の診断では X 線写真撮影が用いられている。他の診断方法として、MRI 検査、CT 検査、問診、(歩き方などを診る)視診、触診、血液検査などを行い、総合的に診断を行う。

変形性膝関節症のメカニズムと症状は以下のとおりである^[1, 2]。

- ①骨の表面に磨耗が起こり、これを補うために軟骨細胞が増加する。
また、軟骨の水分含量が増し、軟骨が軟化する。この時、自覚症状は無い。
- ②軟骨の磨耗が徐々に進行し、関節への負担が増し関節炎が発症する。この頃から膝の曲げ伸ばしに痛みを感じるようになる。
- ③軟骨の水分保持能力が減少、軟骨の水分や弾力が失われていく。
また、膝を曲げづらくなる(可動域制限)。
滑液が大量に分泌され、関節水腫を起こす場合がある。
- ⑤軟骨の磨耗がさらに進行、変形・消失することにより、軟骨の下骨が徐々に露出されるようになる。実際に骨同士が擦れ合い、痛みがひどくなる。
- ⑥骨同士のぶつかりにより骨の変形(骨棘など)が始まる。
関節の安定が失われ、歩行時の安定性に欠ける。痛みは安静時・睡眠時にも続く。

1-1-3 現行の変形性膝関節症治療とその問題点

現在行われている変形性膝関節症の治療は、「保存療法」と「手術療法」の2種類に大きく分けられる。

保存療法は症状が軽い段階の患者に行われる手段であり、主に大腿四頭筋を強化する運動療法、薬物を用いる薬物療法、サポーターを用いる装具療法などがある。対して、手術療法は病状が進行し保存療法では改善しない場合に行われる。手術法には関節鏡視下手術、人工膝関節置換術などがある。

しかし、保存療法や手術療法は関節軟骨を再生させるという根本的な治療ではない。さらに、手術療法では術後の感染や合併症、人工関節の磨耗粉の発生による炎症などリスクが生じる。また、手術を受ける重症の患者は高齢の方が多いため、骨粗鬆症が進行している場合や心臓などの全身状態が不良の場合は、手術を行えない。

以上の問題点から、根本的な原因である磨耗・損傷した関節軟骨を再生させる治療が必要である。

1-2 再生医療と組織工学

先述のような、根本的な原因である磨耗・損傷した関節軟骨を再生させるためには、再生医療が有効である。

再生医療(regeneration medicine)とは、損傷を受けた生体機能を復元させる医療である。この再生医療の一役を担う分野に、細胞とバイオマテリアルを組み合わせることで生体組織を創り出す、組織工学(Tissue Engineering)がある。

1-2-1 組織工学

組織工学では大きく3つの要素、すなわち、組織の機能を再生するための「細胞」、その細胞の土台となり組織を支持するための「足場材料」、そして細胞の機能を制御するための「サイトカイン」を組み合わせることで成立するとされる。

足場材料は、移植先に対し毒性がなく生体適合性を有することが前提条件であり、さらに移植する組織の機能・構造、及び細胞とその環境への理解が必要となる。

細胞の周囲には細胞外マトリックス(Extracellular Matrix ; ECM)が存在しており、ECM は細胞の活動・機能を制御する役割を持つ。

つまり、ECM と細胞との関係に対する理解が、組織工学の重要な課題となる。

1-2-2 軟骨とその構造

軟骨は細胞と ECM から成る、血管を持たない均一な結合組織である。軟骨には硝子軟骨、弾性軟骨、線維軟骨の3つの種類があり、関節軟骨は硝子軟骨に分類される。本節では、硝子軟骨について述べる。

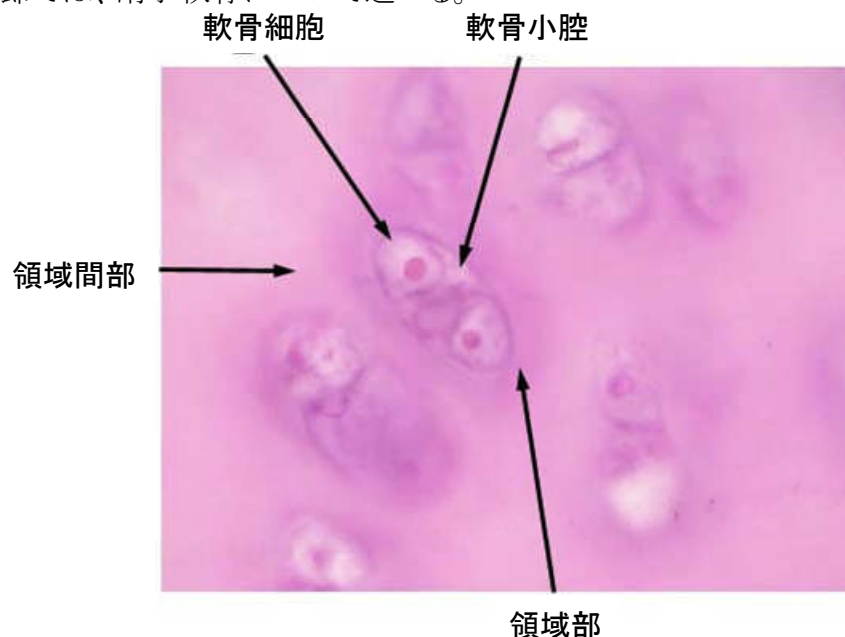


Fig.1-3 硝子軟骨(HE 染色) ^[5]

軟骨組織はコラーゲン繊維とプロテオグリカンが混合されたもので、光学顕微鏡下では均一無構造に見え、好塩基性を示す。軟骨細胞は軟骨組織の間の小さい裂け目である軟骨小腔の中に 1～数個存在しており、主に軟骨組織の形成、維持を担う。領域部は軟骨小腔周辺で特に好塩基性の強い部分であり、合成されたばかりのコンドロイチン硫酸などが多く存在する^[5]。

次に、軟骨組織を構成する ECM について説明するために、Fig.1-4 に硝子軟骨の ECM 組織図を示す。

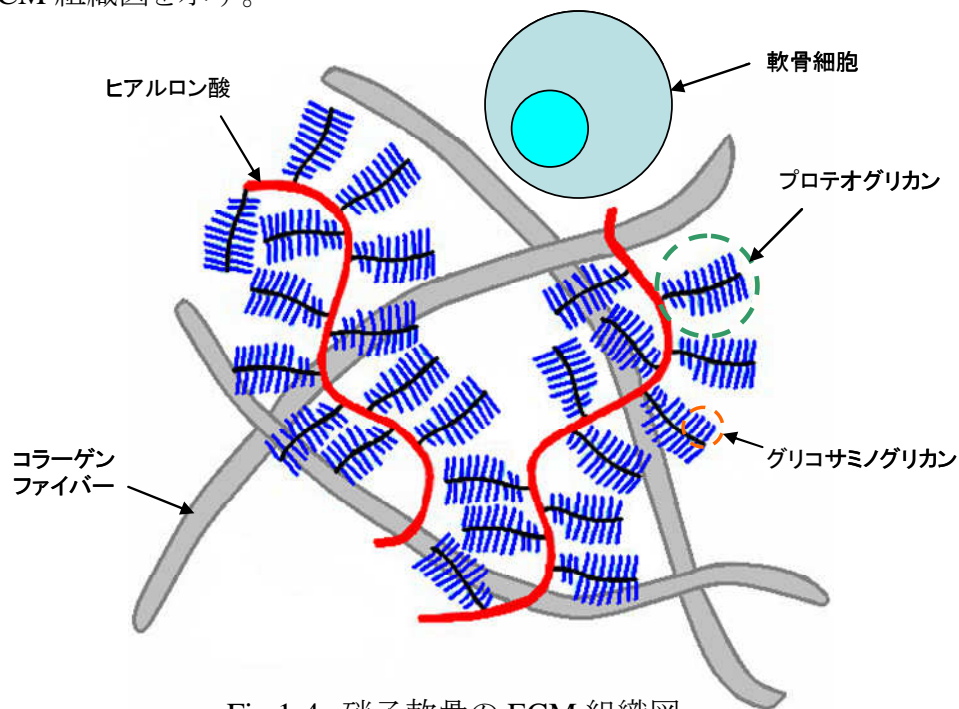


Fig.1-4 硝子軟骨の ECM 組織図

軟骨組織の大半(60~80%)は電解質を含む水分が占めている。他の 10~20%がコラーゲン、5~7%がプロテオグリカンで構成されており、網目状に走っているコラーゲン線維の間にプロテオグリカン集合体が詰まって存在している。また、これらの ECM 以外にも Table.1 に記載されているような様々な分子が複雑に作用し合うことで、軟骨組織は形成・維持されている。

機械的な主な役割として、コラーゲンは組織の形体維持、プロテオグリカンは水分保持による緩衝作用を担っており、水分が組織を出入りすることで関節へかかる負荷や摩擦を軽減している。また、この水分(滑液)は滑膜によって血液がろ過されたものであり、栄養分を豊富に含んでいるため、軟骨組織はこの水分の出入りによって栄養供給が成されている。

Table.1 硝子軟骨を構成するマクロ分子^[6]

Component	Elements	Weight
Water		60–80%
Collagen type II		10–20%
Aggregating PGs	HA, KS, C4S, C6S	5–7%
Aggrecan		
Versican		
Non-aggregating PGs		<5%
SLRP class I	Biglycan, Decorin	
SLRP class II	Fibromodulin, Lumican, PRELP, Perlecan, Epiphygan	
Syndekan family	Amphiglycan, TGF- β 3 Receptor β 3 glycan, Glypican	
Other collagen types	Collagen types III, V, VI, VII, IX, X, XI, XII, XIV	
Non-collagenous and glycoproteins	COMP Link protein, Anchorin, Fibronectin, Tenascin, Thrombospondin, Chondroadherin, Fibrillin	
Lipids	Phosphatidylserine	

*HA : hyaluronic acid , KS : keratan sulfate

C4S,C6S : chondroitin-4-*O*-sulfate,-6-*O*-sulfate

SLRP : small leusine-rich proteoglycan

PRELP : prolin arginine-rich and leucine-rich repeat protein

COMP : cartilage oligomeric matrix protein (=Thrombospondin-5)

次に、軟骨組織を形成する主な ECM である、コラーゲンとプロテオグリカンについて簡潔に述べる。

【コラーゲン】

コラーゲン(collagen)とは、生体を構成するタンパクの中で最も多く存在するタンパクである。様々な結合組織に力学的強度を与えるだけでなく、細胞足場となり細胞の増殖や機能維持などの役割も持つ。コラーゲンペプチドのアミノ酸配列は Gly-X-Y の繰り返し構造で表され、X にはプロリン、Y にはヒドロキシプロリンが頻出する特徴を持つ。コラーゲン線維はコラーゲンペプチドの重合体である。

軟骨組織には、主に II、IX、X、XI 型コラーゲンが存在する^[6]。

【プロテオグリカン】

プロテオグリカン(proteoglycan)とはコアタンパクにグリコサミノグリカンと呼ばれる硫酸化多糖が共有結合してできる糖タンパクの一種であり、1 本のコアタンパクに 1 本～多数のグリコサミノグリカンが結合したブラシ状の構造を持つ。このプロテオグリカンは細胞表面や ECM の主要成分となっており、特に軟骨組織では ECM 中に多く存在する。

軟骨組織の ECM 中に存在しているプロテオグリカンはリンクタンパクによってヒアルロン酸に結合し、プロテオグリカン集合体を形成している(Fig.1-5)。このようなプロテオグリカンのほとんどが巨大コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるアグリカンであり、アグリカンは軟骨に存在するプロテオグリカンの約 90%を占めている^[7]。

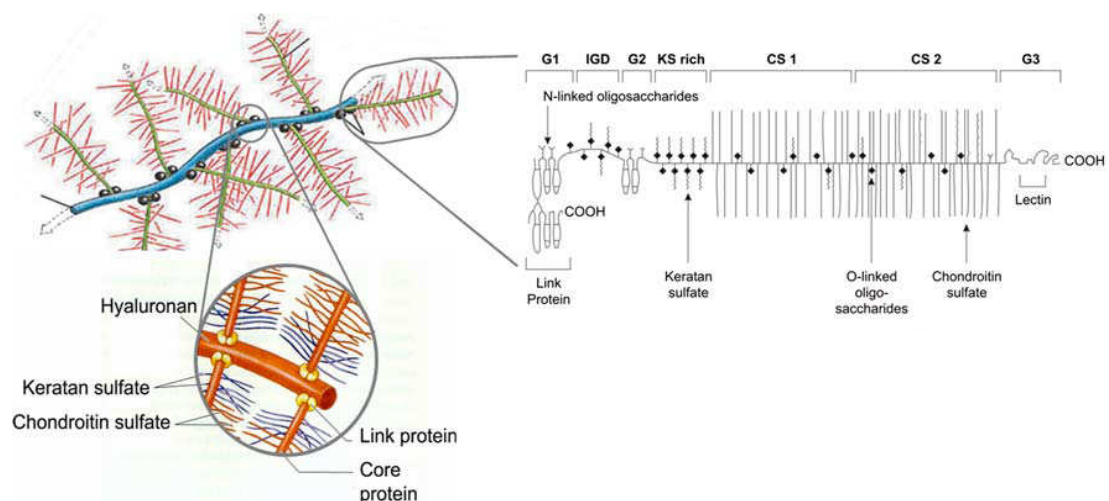


Fig.1-5 プロテオグリカンとその集合体の構造^[6]

巨大コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるアグリカンは、細胞接着分子と結合し細胞接着部位をマスクして接着を弱め、細胞移動を促進させる効果がある。また、同様に巨大コンドロイチン硫酸プロテオグリカンであるバーシカン(PG-M)も、軟骨組織形成の初期段階において一過性に発現し、同様に細胞接着を弱めて細胞移動を促進させ、軟骨形成を促進させる役割を果たしている^[7]。

これらに対し、シンデカンのような細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンは、成長因子などの機能分子や ECM と結合し、細胞の接着・増殖・分化などに重要な役割を果たしている^[7]。

1-2-3 関節軟骨再生用材料

上述のように、軟骨組織は主にⅡ型コラーゲンとプロテオグリカンで構成されている。その中でもプロテオグリカンは、その構造の多様性から細胞活動へ影響を及ぼす様々な機能を有している。そこで、プロテオグリカンの有する様々な機能の源であるグリコサミノグリカンに着目した。

1-3 グリコサミノグリカン

1-3-1 グリコサミノグリカンとは

グリコサミノグリカン (glycosaminoglycan; GAG) は直鎖状の硫酸化多糖であり、殆どがプロテオグリカンの糖鎖として存在する。グリコサミノグリカンの合成・分泌は主に結合組織に存在する細胞によって行われているが、動物種や存在部位によって構造的・機能的に異なることが知られている。

グリコサミノグリカンはその大部分がアミノ糖 (D-グルコサミン、D-ガラクトサミンなど) とウロン酸 (D-グルクロン酸、L-イズロン酸など) の二糖繰り返し構造からなり、様々な程度に O-硫酸化または N-硫酸化されている (ヒアルロン酸を除く)^[7]。グリコサミノグリカンはその骨格構造や硫酸基の位置によりコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸など様々な名称に分類される (Fig.1-6a~1-6c)。

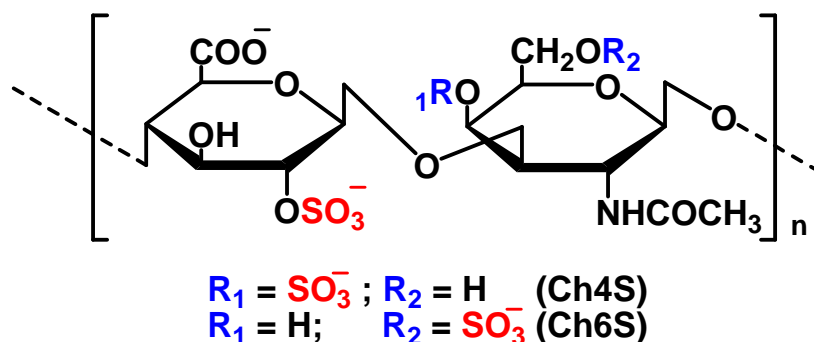


Fig.1-6a コンドロイチン-4-硫酸、-6-硫酸の基本構造^[8]

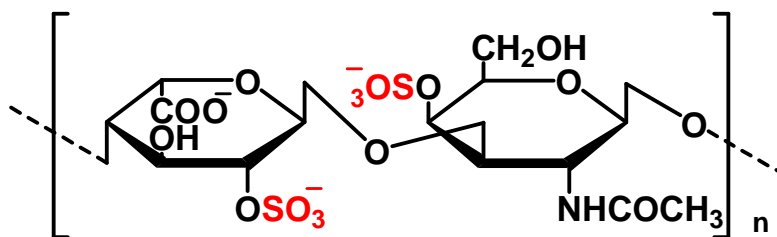


Fig.1-6b デルマタン硫酸の基本構造^[8]

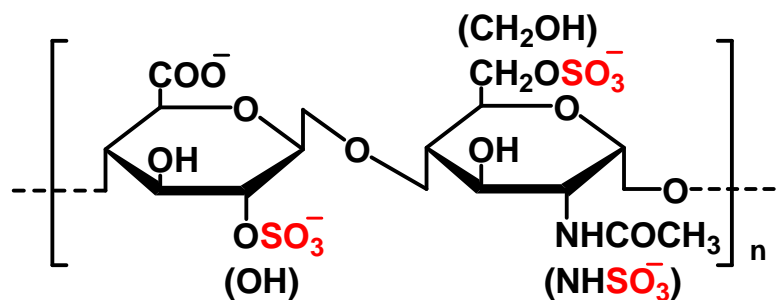


Fig.1-6c ヘパラン硫酸の基本構造^[8]

1-3-2 グリコサミノグリカンの主な働き

グリコサミノグリカンとは、自身の硫酸基部位と成長因子などの機能分子との相互作用によるタンパク吸着能を有しており、細胞の接着・増殖・分化、創傷治癒、神経再生など生体内の様々な現象に関っている。また、組織の構成物質として、組織の維持やその強度、柔軟さなどに重要な役割を果たすとともに、細胞外液の容量調節、電解質(特に陽イオン)の移動、カルシウムの組織での平衡と沈着(化骨や石灰化など)、軟組織の線維化など、重要な機能を果たしている^[8]。また、軟骨組織においては保水性維持の一役も担っているため、軟骨組織を再生させるために必須の物質といえる。

すなわち、グリコサミノグリカンと同等な機能を有する材料を用い、これに軟骨細胞を播種・培養することで軟骨組織再生用材料の開発が可能になると期待できる。

そこで本研究では、

- ①生体適合性を有する多糖類
- ②グリコサミノグリカン様の基本骨格を有する多糖類
- ③軟骨細胞は三次元培養によって軟骨組織を形成するという報告があることから、ゲル化能を有する多糖類

この3点に注目した。

この3つの条件に当てはまる物質として、ネイティブジェランに硫酸基を導入した硫酸化ネイティブジェラン、脱アシル型ジェランにカルボキシメチル基を導入したカルボキシメチルジェランを選択した。

1-4 ジェランガム

ジェラン(Gellan)は *Sphingomonas elodea* という微生物が菌体外に産出する多糖類であり、増粘安定剤(増粘、ゲル化、安定)として各種食品に幅広く利用されている^[9]。ジェランにはネイティブジェランと脱アシル型ジェランの2種類が存在する。

1-4-1 ネイティブジェランと脱アシル型ジェラン

ネイティブジェラン(Native Gellan; NG)は、先の研究から優れた生体適合性を有することが証明されている、湿潤性に富む抗血栓性材料である^[10-12]。ネイティブジェランは直鎖状の多糖類であり、1,3-β-D-グルコース、1,4-β-D-グルクロン酸、1,4-β-D-グルコース、1,4-α-L-ラムノースの4糖の繰り返し構造から成り、グルコースの2位がグリセリル基で、6位が $1/2$ の割合でアセチル基により修飾された構造を有している(Fig.1-7a)。また、このアセチル基とグリセリル基を除いたジェランが、脱アシル型ジェラン(de-acyl type gellan; DG)である(Fig.1-7b)。

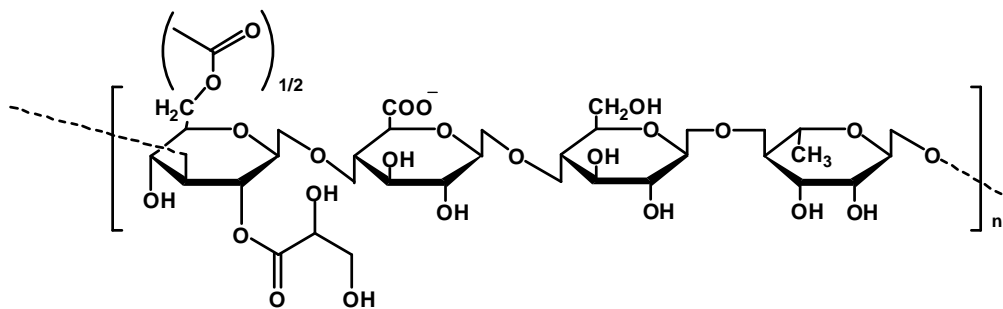


Fig.1-7a ネイティブジェランの構造

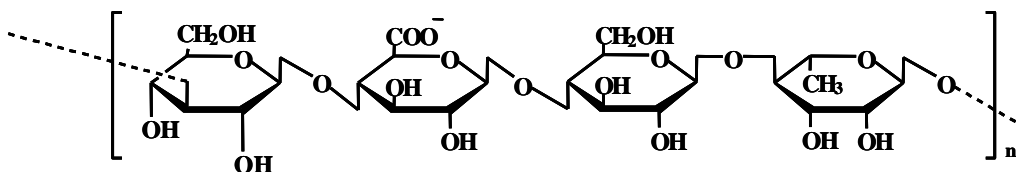


Fig.1-7b 脱アシル型ジェランの構造

1-4-2 硫酸化ネイティブジェラン

硫酸化ネイティブジェラン(Native Gellan Sulfate; GS)はネイティブジェランから誘導され、ネイティブジェランとクロロスルホン酸を反応させることで得られる。硫酸化ネイティブジェランはネイティブジェランの水酸基が硫酸化された構造を持ち、先の研究から、硫酸化の優先順位はD-グルコースの6位、次いでL-ラムノースの2位と硫酸化された後、その他の水酸基が硫酸化されていくことが判明している^[11]。

硫酸化ネイティブジェランの例として、先の研究^[8]から硫酸基の位置が判明している、硫酸化率 32.0%の硫酸化ネイティブジェランの構造を Fig.1-8 に示す。

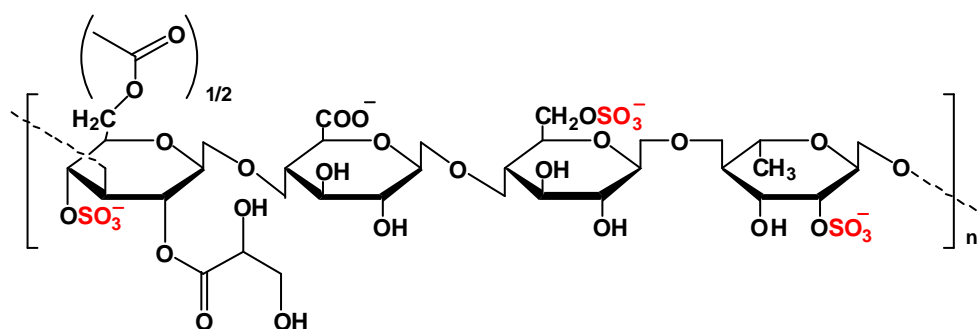


Fig.1-8 硫酸化ネイティブジェラン(硫酸化率 32.0%)の構造^[8]

硫酸化ネイティブジェランには、先の研究^[10, 11]からテネイシン-C (Tenascin-C : TN-C) や塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor ; b-FGF (FGF-2)) と高い親和性を持つことが判明している。この2つのタンパクは創傷治癒過程における発現や関節軟骨修復過程における発現が確認されており^[10-13]、これらのタンパクと硫酸化ネイティブジェランとを組み合わせたハイブリッド材料(組織修復、関節軟骨修復)としての利用が期待できる。また、これらのタンパクはヘパリン結合性タンパクとしても知られている (Table.2) ため、硫酸化ネイティブジェランはその他のヘパリン結合性タンパクとも高い親和性を有する可能性が考えられる。

Table.2 ヘパリン結合性タンパク^[8]

成長因子	FGF-1 , FGF-2 , FGF-3 , FGF-4 , FGF-5 , FGF-6 , FGF-7 ヘパリン結合性 EGF(epidermal growth factor; 上皮細胞増殖因子) HGF(hepatocyte growth factor; 肝細胞増殖因子) VEGF(vescular endothelial growth factor; 血管内皮細胞増殖因子), ミッドカインなど
マトリックス接着分子	フィブロネクチン , ビトロネクチン , ラミニン , コラーゲン , トロンボスポンジン テネイシン、オステオポンチンなど
代謝関連	リポタンパク質リパーゼ , 肝性リパーゼ , アポリポタンパク質 B アポリポタンパク質 C , フォスホリパーゼ , ジムサターゼ , エラスターゼなど
血液凝固関連	アンチトロンビンⅢ , ヘパリン補助因子(cofactor)Ⅱ , プロテイン(protein)C 血小板因子(platelet factor)Ⅳ など
その他	トポイソメラーゼ , DNA ポリマラーゼ , RNA ポリマラーゼ , 転写因子 腫瘍壊死因子など

1-4-3 カルボキシメチルジェラン

カルボキシメチルジェラン (Carboxymethyl Gellan; CMG) は脱アシル型ジェランから誘導され、濃アルカリ中で脱アシル型ジェランとモノクロ酢酸を反応させることで得られる。カルボキシメチルジェランは脱アシル型ジェランの水酸基がカルボキシメチル基に置換された構造を持ち (Fig.1-9)、先の研究^[14]から、置換度は反応条件を変えることで制御可能である。

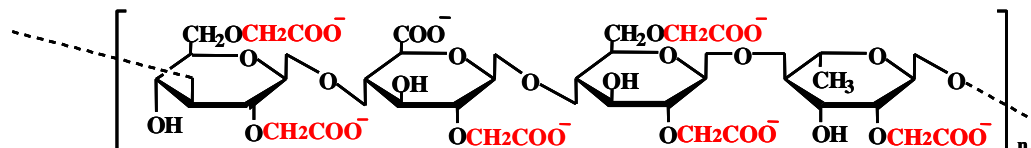


Fig.1-9 カルボキシメチルジェランの構造例^[15]

CMG はカルボキシル基の導入により、ネイティブジェラン・脱アシル型ジェランと比較して溶解性が向上しており、材料の形成がより容易に行える。また、CMG のゲル化は温度に依存せず、CMG のカルボキシル基と架橋剤のアミノ基を用いた化学架橋によりゲルが形成される。

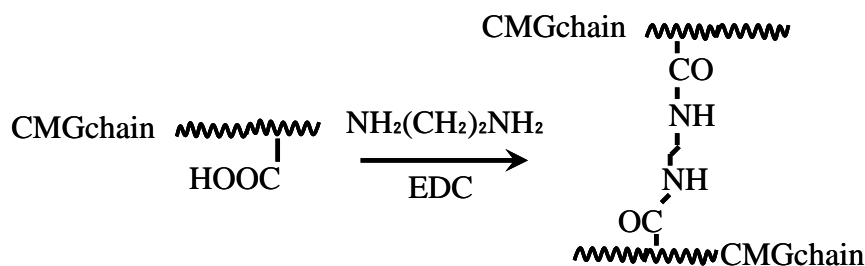


Fig.1-10 化学架橋によるゲルの形成例^[15]

さらに、硫酸化ネイティブジェラン単体では水溶性が高く材料化が困難である。そこで、カルボキシメチルジェランと複合・ゲル化させることで形成される GS 固定化 CMG ゲル (GS-CMG ゲル)、すなわち、グリコサミノグリカン様足場材料としての材料化が可能であり、効果的に軟骨組織を形成できるゲル材料になると考えられる。

しかし、上述のような材料として扱うにあたり、硫酸化ネイティブジェランと細胞とがどのような応答を行っているか、という点を調査することが、組織再生を行うにあたり重要となってくる。この細胞応答を調査することで、より効果的に組織再生を誘導できる硫酸化ネイティブジェラン材料を作製できると考えられる。

1-5 目的

1-5-1 目的

本研究の目的は、軟骨組織を形成・再生させるために重要な軟骨細胞と硫酸化ネイティブジェランとの応答評価の調査、及び、調査を可能にするための GS 含有足場の作製と評価である。

1-5-2 実験項目

実験は以下の項目に分けて行った。

1. 二次元培養基材の作製

【内容:GS を足場とする条件を整えるために、コーティングシャーレを作製した。】

- ・GS コーティングシャーレの作製
- ・接触角測定
- ・ESCA による表面分析

2. GS の作用評価

【内容:組織工学材料として用いるために、GS が細胞に与える影響を調査した。】

- ・細胞増殖試験
- ・GS 添加による形態変化調査
- ・表面抗原解析による表現型調査

3. 三次元培養担体の作製とその評価

【内容:三次元細胞足場の作製とその物理学的評価を行なった。】

- ・CMG の調製
- ・CMG ゲルの作製
- ・GS-CMG ゲルの作製
- ・弾性率測定
- ・膨潤率測定
- ・ゲル化時間測定
- ・SEM 撮影

2. 方法

2-1 二次元培養基材の作製

GSを足場とする条件を整えるために、GSを底面に固定化したコーティングシャーレの作製、及び、固定化の確認を行った。

2-1-1 GS コーティングシャーレの作製

【GS 溶液の調製】

GSを滅菌水に溶解させて所定の濃度に調製した後、フィルター滅菌を行った。

【細胞培養用コーティングシャーレの作製】

Φ35浮遊培養用シャーレに対しコロナ放電処理を行った後、シャーレにGS溶液を添加し整置・固定化した。その後PBSで洗浄し実験に用いた。

コントロールとして、同様の方法で作製したNGコーティングシャーレを用いた。

【接触角測定用コーティングシャーレの作製】

上述の方法でGSを固定化させた後に、脱イオン水で洗浄、風乾した。

コントロールとして、GSを含まない水コーティングシャーレを用いた。

2-1-2 接触角測定

作製した測定用シャーレ表面に水滴を静かに載せるように、無作為に9回置き、液滴の接触角を測定した。

原理については8.付録を参照。

2-1-3 ESCA による表面分析

接触角測定用GSコーティングシャーレの壁面を取り去り、底面を適切な大きさに切断、これを試料とした。

ESCAの原理については、8.付録を参照。

2-2 GS が軟骨細胞に与える影響

GS が細胞へ与える影響を検証するために、種々の調査を行った。

2-2-1 細胞の培養と継代

正常ヒト膝関節軟骨細胞(以下、軟骨細胞)(Takara Bio)を 37℃/5%CO₂ インキュベーター(池本理化工業)内で培養した。培地はペニシリンストレプトマイシン(Sigma)、L-グルタミン(Sigma)、ITS+ Premix(Becton Dickinson)、L(+)-アスコルビン酸(Wako)を添加した high-glucose DMEM(Sigma)を用い、3 日に 1 度培地交換を行った。sub-confluent(70-80%)状態に増殖した時点でトリプシン処理によって軟骨細胞を剥離させ、細胞懸濁液を調製し継代培養を行った。

2-2-2 細胞増殖試験

GS が細胞増殖に与える影響を、GS コーティングシャーレを用いて調査した。

【手順】

GS の濃度、硫酸化率を変化させた GS コーティングシャーレに軟骨細胞を播種、所定期間の培養後に細胞を剥離し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。

コントロールとして、Φ35 接着培養用シャーレ、NG コーティングシャーレで培養した細胞数を計測した。

2-2-3 GS 添加実験

GS が細胞形態に与える影響を、GS 添加培地で細胞培養を行い、写真撮影をすることで調査した。

【GS 培地の調製】

GS を培地に溶解させて所定の濃度に調製した後、フィルター滅菌を行った。

【GS 添加培養】

GS の濃度、硫酸化率を変化させた GS 培地で細胞播種初日から培養、所定期間の培養後に位相差顕微鏡を用いて写真撮影を行った。

2-2-4 表面抗原解析

GS 添加により、軟骨細胞の再分化が示唆された。そこで、軟骨細胞の表面抗原を解析することで、軟骨細胞の表現型を調査した。

【手順】

GS 添加培養の所定日に細胞を剥離、2% FBS/PBS で洗浄後に各抗体を適量添加し反応させた。その後、2% FBS/PBS で洗浄し測定に用いた。

2-3 三次元培養担体の作製とその評価

軟骨細胞は三次元培養において軟骨基質の産生が向上するという報告がある。しかし GS 単体ではゲル(三次元培養担体)を形成しない。そこで、GS を含むゲルの作製、及び、作製したゲルの物性評価を行った。

2-3-1 CMG の調製

脱アシル型ジェラン(DG)に反応剤であるモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させることで、カルボキシメチルジェラン(CMG)を調製した。

【手順】

50wt% NaOHaq.条件下で DG を膨潤させた後、氷浴上でモノクロロ酢酸ナトリウムを所定量少しずつ添加し、均一になるまで攪拌した。その後、常温で攪拌させて反応させ、反応物を脱イオン水に溶解させた。溶解させた反応物を透析、ろ過、濃縮、凍結乾燥を経て CMG を作製した。

2-3-2 CMG ゲルの作製

CMG は単体ではゲルを形成しない。そこで、CMG のカルボキシル基同士を架橋剤である L-Lysine Methyl Ester(以下、Lysine)と縮合剤である水溶性カルボジイミド(以下、WSCD)を用いた、カルボジイミド法による化学架橋によりゲルを作製した。

【手順】

2つの容器を準備し、一方には CMG と Lysine を、もう一方には WSCD を量り取った。CMG と Lysine の容器には培地を 400 μ l 加え溶解、WSCD の容器には PBS を 100 μ l 加え溶解させた。この2種類の溶液を混合させ、型に移してゲルを作製した。

2-3-3 GS-CMG ゲルの作製

GS の三次元における基質評価を行うために、GS 固定化 CMG ゲル(GS-CMG ゲル)の作製を行った。カルボジイミド法を用いることで、基質である CMG のゲル化と、CMG 鎖への GS 鎖固定化を同時に行うことが可能である。

【手順】

2-2-2 と同様に行いゲルを作製した。CMG と Lysine 側に GS を追加してから溶解させた。

2-3-4 弾性率測定

作製したゲルの物性評価として測定した。

測定には、本研究室にある圧縮弾性率測定器を用いた。

操作の詳細は 8.付録を参照。

【手順】

圧縮弾性率測定用ソフトを起動し、正常に作動することを確認した。測定するゲルの自然長(ゲルの厚さ)を測定し、測定器の台座にゲルをセット後、圧縮弾性率測定用ソフトを起動して測定を開始した。測定は測定限界値に達する、又は、ゲルが破断するまで続けた。

2-3-5 膨潤率測定

作製したゲルの物性評価として測定した。

【手順】

作製したゲルを適当な大きさに切断し、培地中で膨潤、所定の時間にゲルの大きさを測定した。

2-3-6 SEM 撮影

作製したゲルの物性評価として測定した。

【手順】

作製したゲルを 1/4 に切断しサンプルとした。50%, 70%, 90%, 99%エタノールを用いて段階的に脱水を行なった。その後、t-ブチルアルコールに置換を行い凍結乾燥した。測定に用いるまで、サンプルはデシケーター中で保存した。

撮影手順は 8.付録を参照。

3. 結果

3-1 コーティングの評価

3-1-1 接触角測定

コーティングに用いた GS の硫酸化率は 9.8%, 21.5%, 31.7% である。
表記は GS(硫酸化率)とした。

以下にコーティングシャーレ表面の接触角を示す(Fig.3-1a,b,c)。

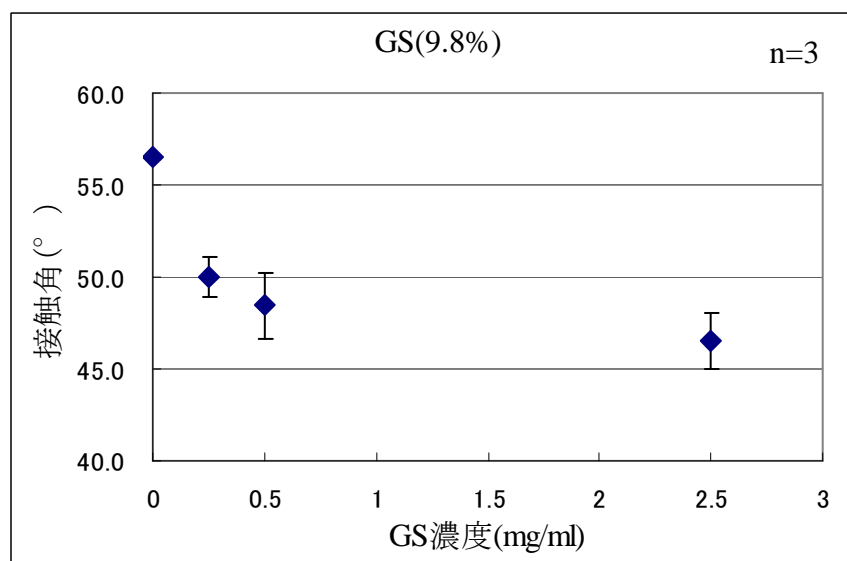


Fig.3-1a GS(9.8%)の接触角測定

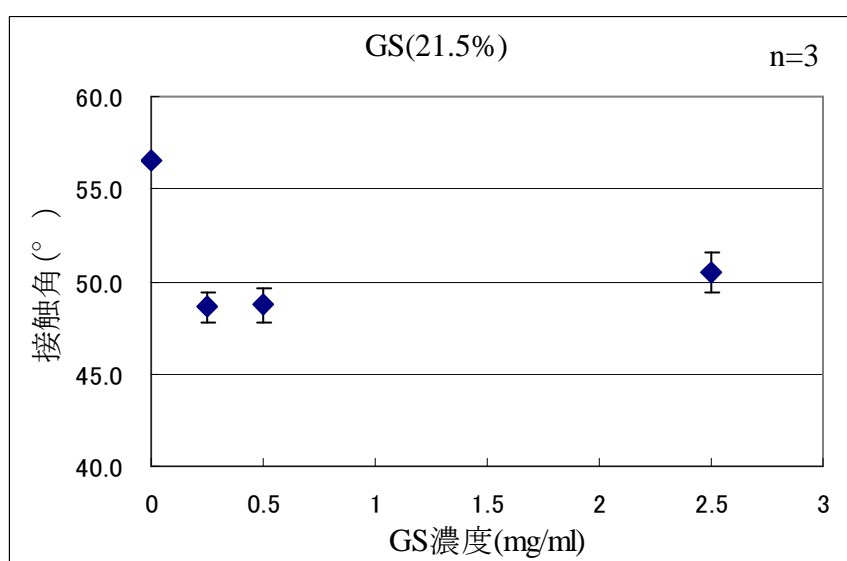


Fig.3-1b GS(21.5%)の接触角測定

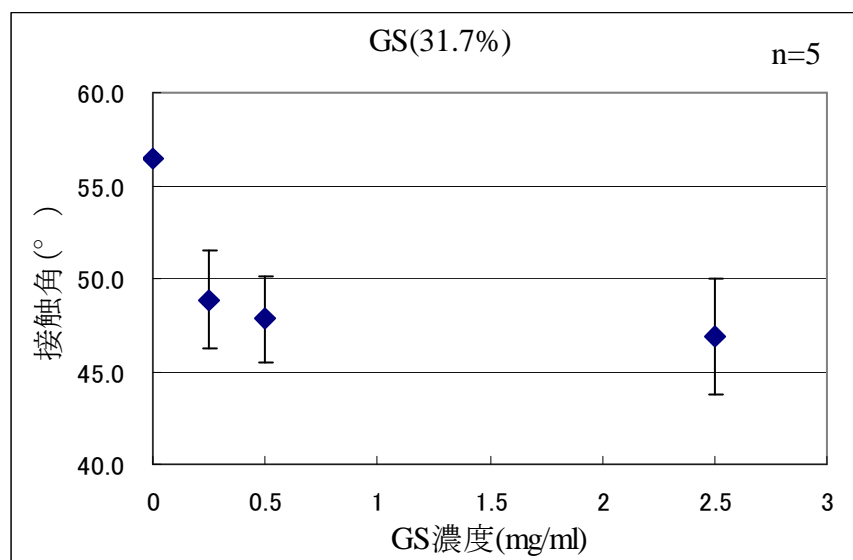


Fig.3-1c GS(31.7%)の接触角測定

どのGSコーティングシャーレにおいても、コントロールの接触角との差が見られたことから、コロナ放電処理によってGSがシャーレ表面にコーティングできていることが分かった。

3-1-2 ESCA による表面分析

コーティングに用いたGSの硫酸化率は21.5%、GS濃度は0.25mg/mlである。F-g.3-2aに表面分析スペクトルを示す。

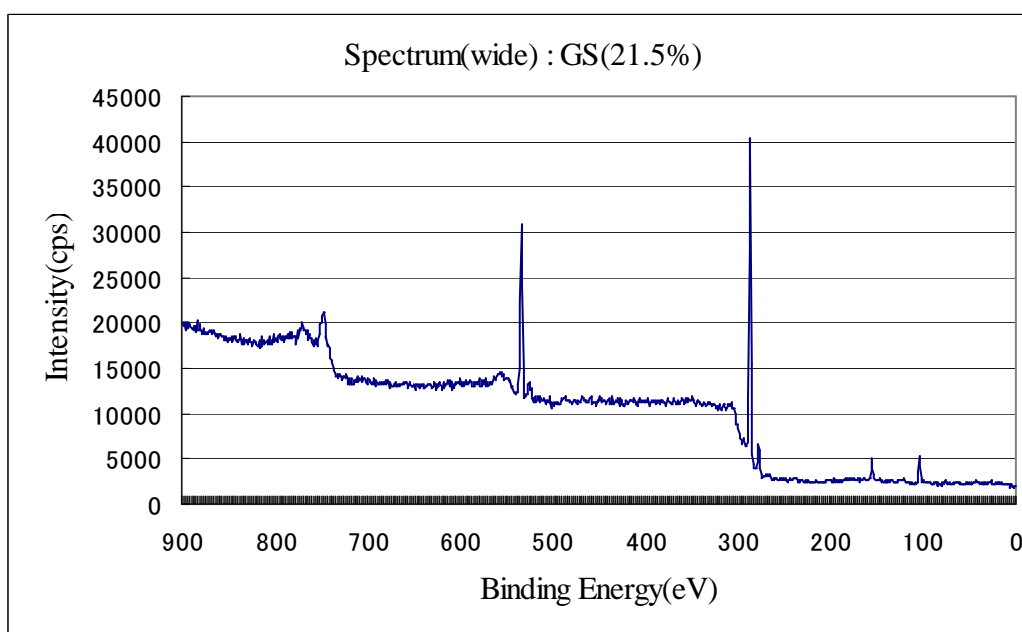


Fig.3-2a コーティングシャーレ・ワイドスペクトル

Fig.3-2a において、硫黄元素の 2s 軌道付近の結合エネルギーを測定したスペクトルを Fig.3-2b に示す。

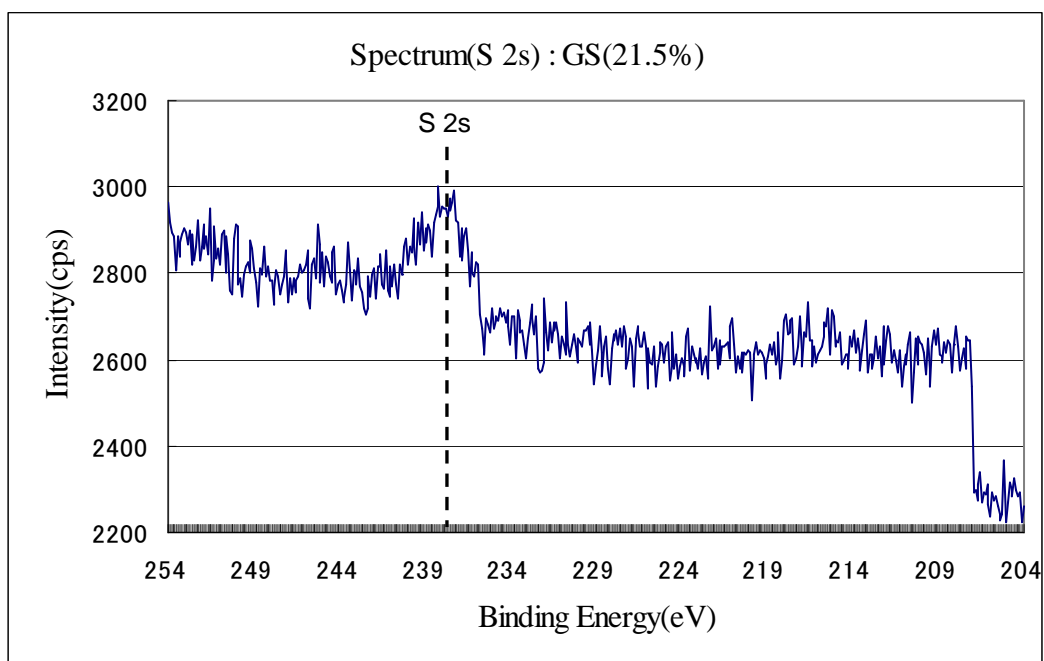


Fig.3-2b コーティングシャーレ・ナロースペクトル(S 2s)

硫黄元素の結合エネルギーが検出されたことから、硫酸基を持つ **GS** がコロナ放電処理によってシャーレ表面にコーティングできていることが分かった。

3-2 GS の作用評価

3-2-1 細胞増殖試験

コーティングに用いた GS の硫酸化率は 12.5%, 31.0% である。細胞播種後、1 日目、3 日目、7 日目、10 日目、14 日目の細胞数を測定した。

Fig.3-3a にコートシャーレ上での細胞増殖試験の結果を示す。

また、Fig.3-3b に培養 1 日目から 14 日目までの細胞増殖率を示す。

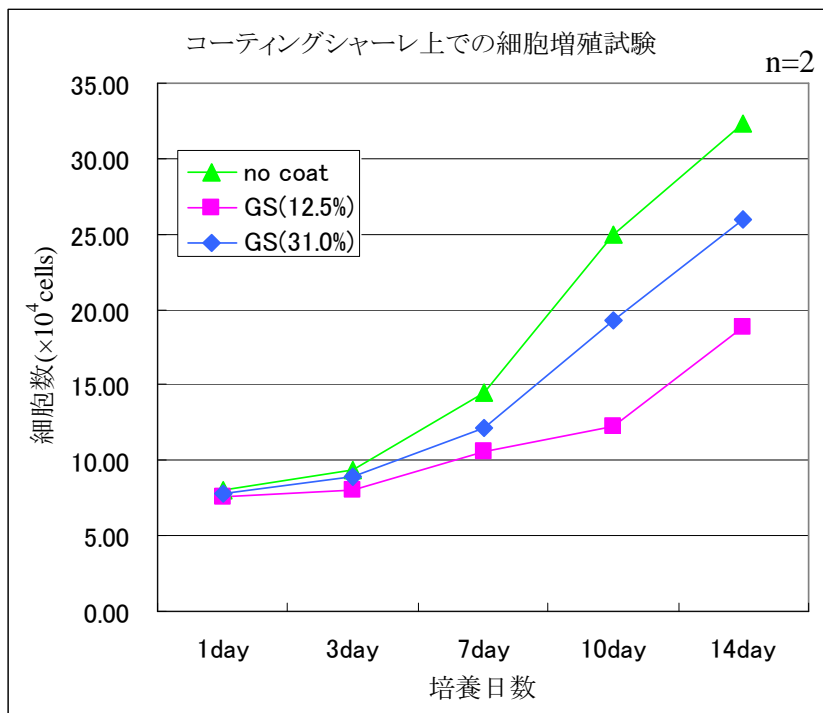


Fig.3-3a コートシャーレ上での細胞増殖試験

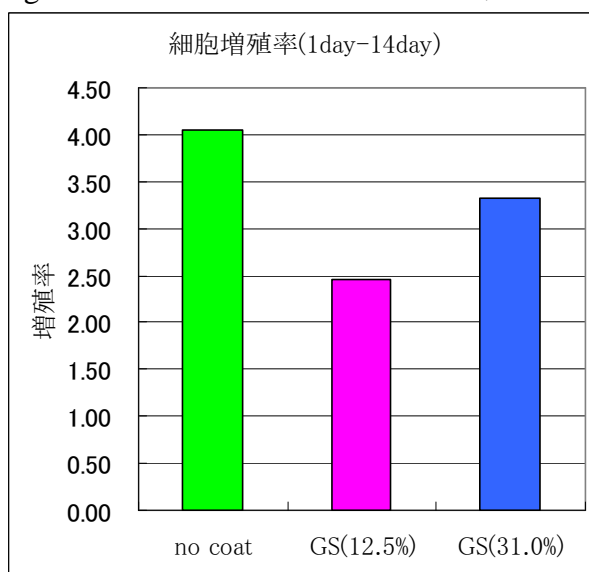


Fig.3-3b 培養 1 日目から 14 日目までの細胞増殖率

Fig.3-3a,b から、GS 上では細胞増殖が抑制されること、また GS の硫酸化率の違いによって、細胞の増殖性に違いがあることが分かった。

3-2-2 GS 添加による形態変化調査

添加に用いた GS の硫酸化率は 12.5%と 31.0%、GS 濃度は共に 100 μ g/ml である。

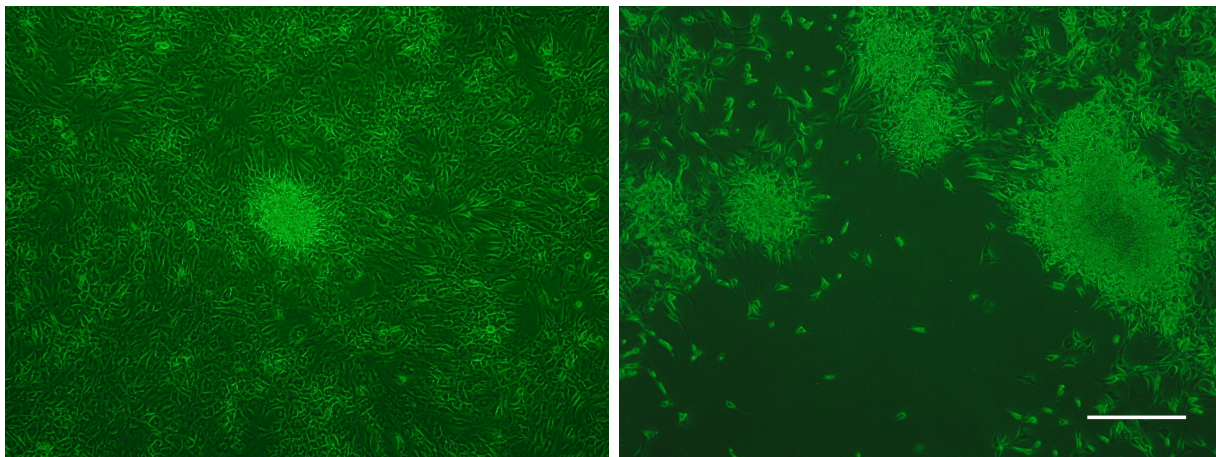


Fig.3-4 GS 添加による軟骨細胞の形態変化 (scale bar = 500 μ m)

左:GS(31.0%)・培養 14 日目、右:GS(12.5%)・培養 7 日目

培養 7 日目において GS(12.5%)添加で、培養 14 日目において GS(31.0%)添加で細胞塊が見られるようになった。細胞塊の形成は軟骨細胞に見られる特徴であり、形態としては軟骨細胞様に変化したと言える。

3-2-3 表面抗原解析による表現型調査

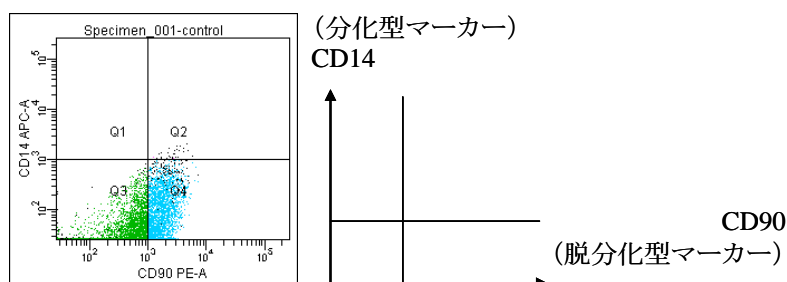
GS 添加培地で 7 日間培養後、測定に用いた。GS 濃度は 100 μ g/ml である。

【Fig.3-5a,b,c の見方】

左の Fig.:

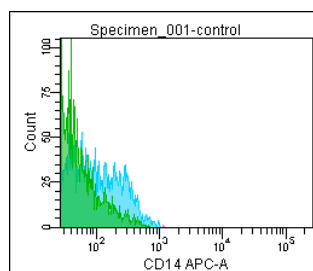
- 各マーカーの発現率
- ・縦軸・・・分化型マーカー
- ・横軸・・・脱分化型マーカー
- ・Q3, Q4 の%・・・

Population の割合



右の Fig.:

分化型マーカーの発現率



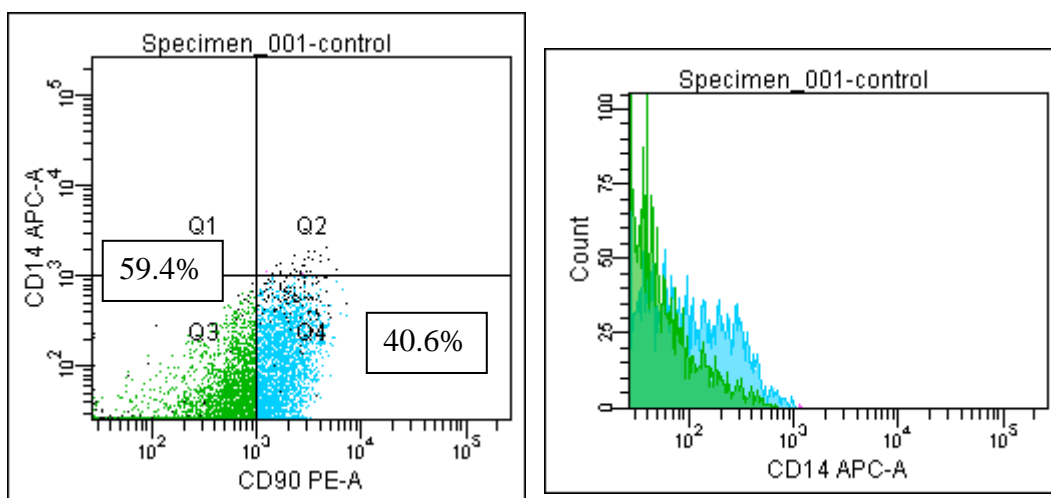


Fig.3-5a GS 無添加細胞の表面抗原解析(control)

Fig.3-5aは、controlとして脱分化型の軟骨細胞の表面抗原を調査した。軟骨細胞を脱分化させるために14日間培養した^[17]。

分化型マーカーであるCD14の発現は見られず、脱分化型マーカーであるCD90の発現は40.6%見られた。よって、controlの細胞は脱分化型と判定した。

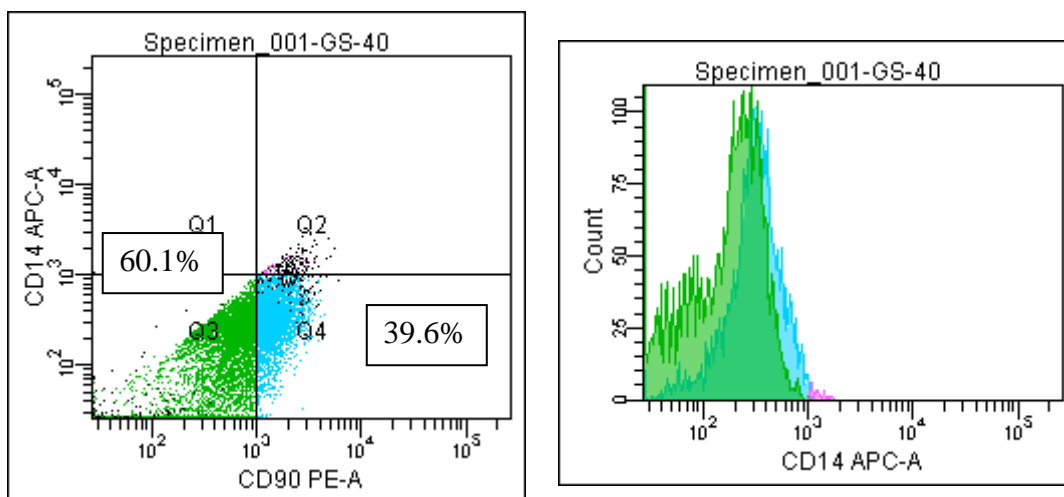


Fig.3-5b GS (12.5%) 添加細胞の表面抗原解析

Fig.3-5bは、低硫酸化率GSとして、硫酸化率12.5%のGS添加の影響を見た。脱分化型マーカーであるCD90の発現が39.6%と、controlと比較して減少した。

分化型マーカーであるCD14の発現は見られないが、controlと比較して、CD14の発現パターンに変化が見られた。

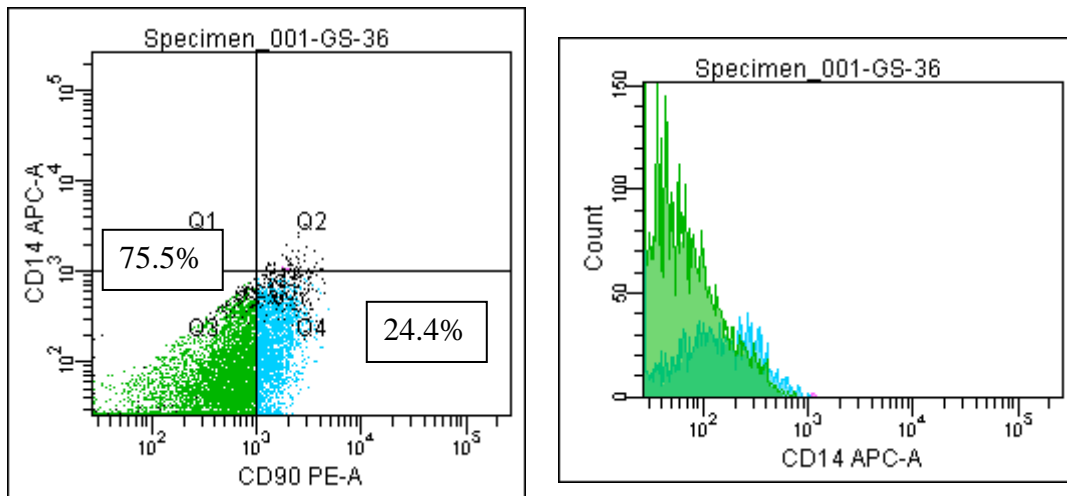


Fig.3-5c GS (31.0%) 添加細胞の表面抗原解析

Fig.3-5c は、高硫酸化率 GS として、硫酸化率 31.0% の GS 添加の影響を見た。脱分化型マーカーである CD90 の発現が 24.4% と、control と比較して減少した。分化型マーカーである CD14 の発現は見られず、低硫酸化率 GS 添加のような CD14 の発現パターンの変化も見られなかった。

3-3 培養担体の評価

3-3-1 弾性率測定

測定したゲルの CMG 濃度は 20wt% に固定して作製した。

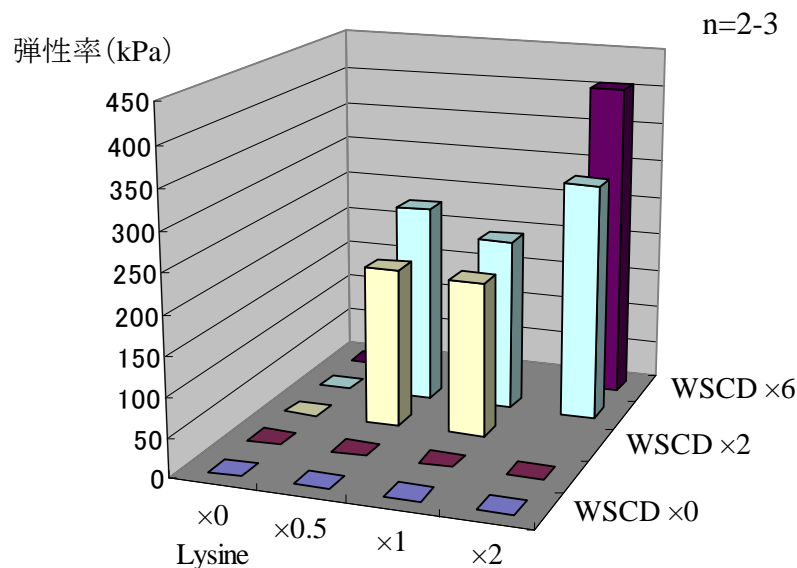


Fig.3-6a CMG ゲル弾性率測定

X 軸が Lysine 量を、Y 軸が WSCD 量を、Z 軸が弾性率を示す。

Table.3-1 CMG ゲルのゲル化の可否と弾性率測定値(単位:kPa)

		WSCD				
		×0	×1	×2	×4	×6
Lysine	×0	-	-	-	-	-
	×0.5	-	-	203.3	255.3	/
	×1	-	-	197.1	222.7	/
	×2	-	-	/	304.4	406.1

* - :ゲル化せず / :未測定

架橋剤を含まない Lysine×0 の条件ではゲルは形成しなかった。また、縮合剤である WSCD×0、×1 の条件でもゲルを形成しなかった。

傾向として、Lysine 量が増加するほど、また WSCD 量が増加するほど弾性率の上昇が見られた。

GS-CMG ゲルに使用した GS の硫酸化率は 31.9%、含有量は 5wt%である。

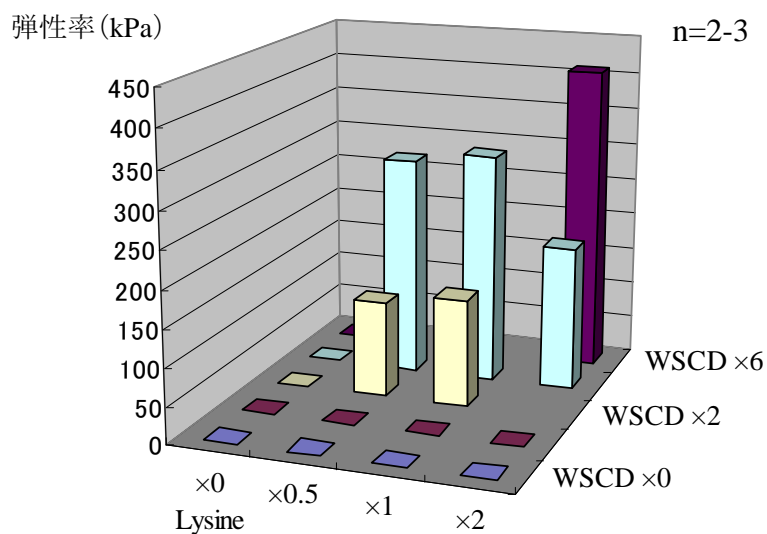


Fig.3-6b GS-CMG ゲル弾性率測定

X 軸が Lysine 量を、Y 軸が WSCD 量を、Z 軸が弾性率を示している。

Table.3-2 GS-CMG ゲルのゲル化の可否と弾性率測定値 (単位:kPa)

		WSCD				
		×0	×1	×2	×4	×6
Lysine	×0	-	-	-	-	-
	×0.5	-	-	128.4	294.3	/
	×1	-	-	144.1	310.0	/
	×2	-	-	/	193.5	409.5

* - :ゲル化せず / :未測定

CMG ゲルと同様に、架橋剤を含まない Lysine×0 の条件ではゲルは形成せず、また、縮合剤である WSCD×0、×1 の条件でもゲルを形成しなかった。傾向として、WSCD 量が増加するほど弾性率の上昇が見られた。

3-3-2 膨潤率測定

測定したゲルの CMG 濃度は 20wt% に固定して作製した。

GS-CMG ゲルを 2mm 角に切断して用いた。膨潤は培地 1ml/ゲルで行った。
使用した GS の硫酸化率は 31.9%、含有量は 5wt% である。

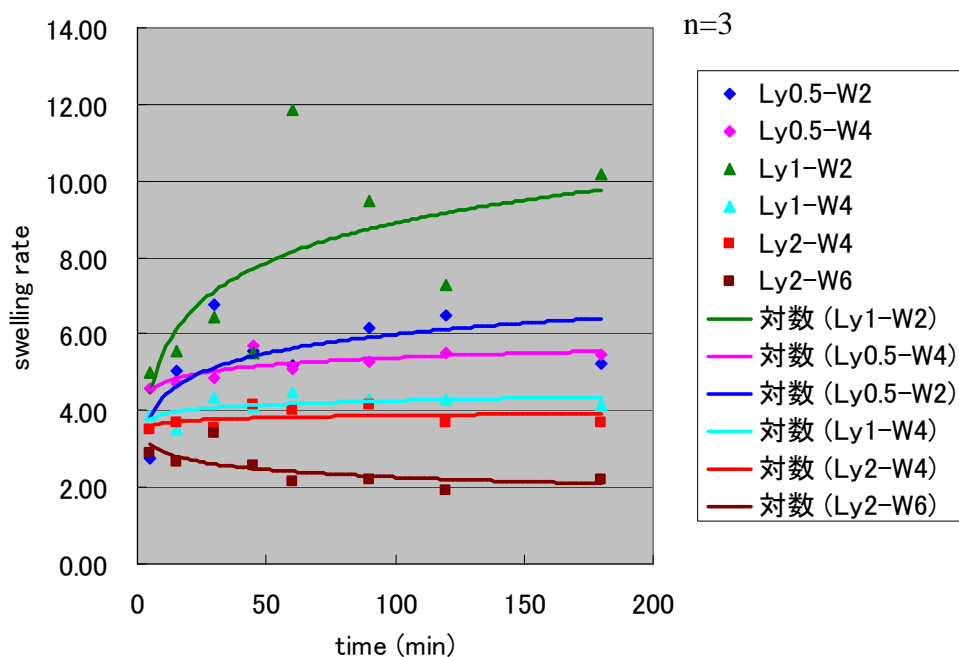


Fig.3-7 GS-CMG ゲルの膨潤率測定
略式表記: Ly0.5-W2・・・Lysine \times 0.5、WSCD \times 2

いずれのゲルも測定開始から膨潤が始まり、開始 120 分以降にはあまり変化が確認されなかった。

膨潤開始から 180 分の時点では、Ly1-W2 が 10.16 倍と最も大きく膨潤し、Ly2-W6 は膨潤が最も小さく、2.18 倍であった。

3-3-3 ゲル化時間測定

測定したゲルの CMG 濃度は 20wt% に固定して作製した。

GS-SMG ゲルに使用した GS の硫酸化率は 31.9%、含有量は 5wt% である。

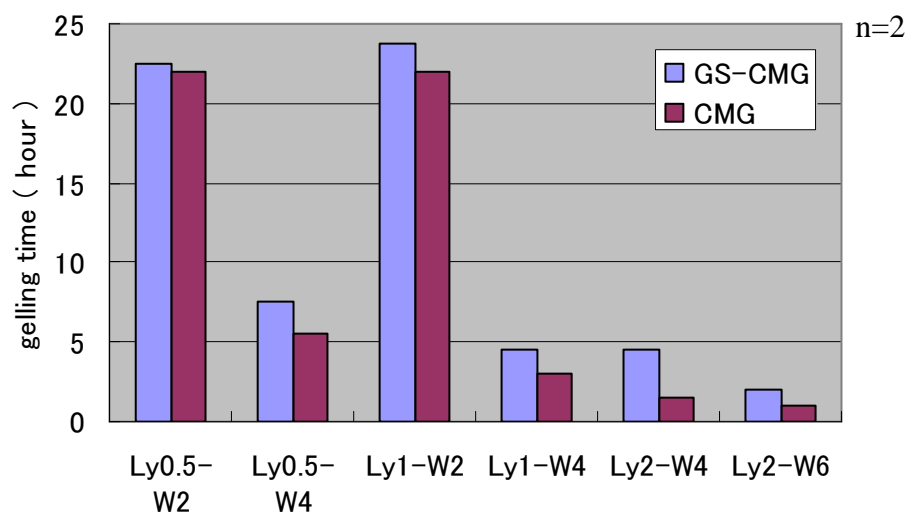


Fig.3-8 CMG ゲル、GS-CMG ゲルのゲル化時間

略式表記: Ly0.5-W2・・・Lysine×0.5、WSCD×2

全ての作製条件において、CMG ゲルより GS-CMG ゲルのほうが、ゲル化時間が長かった。

3-3-4 SEM 撮影

撮影したゲルは以下の 2 種類の GS-CMG ゲルである。

- CMG 20wt% , Lysine $\times 2$, WSCD $\times 6$, GS (31.9%) 5wt% ……以下 Ly2-W6
- CMG 20wt% , Lysine $\times 0.5$, WSCD $\times 2$, GS (31.9%) 5wt% ……以下 Ly0.5-W2

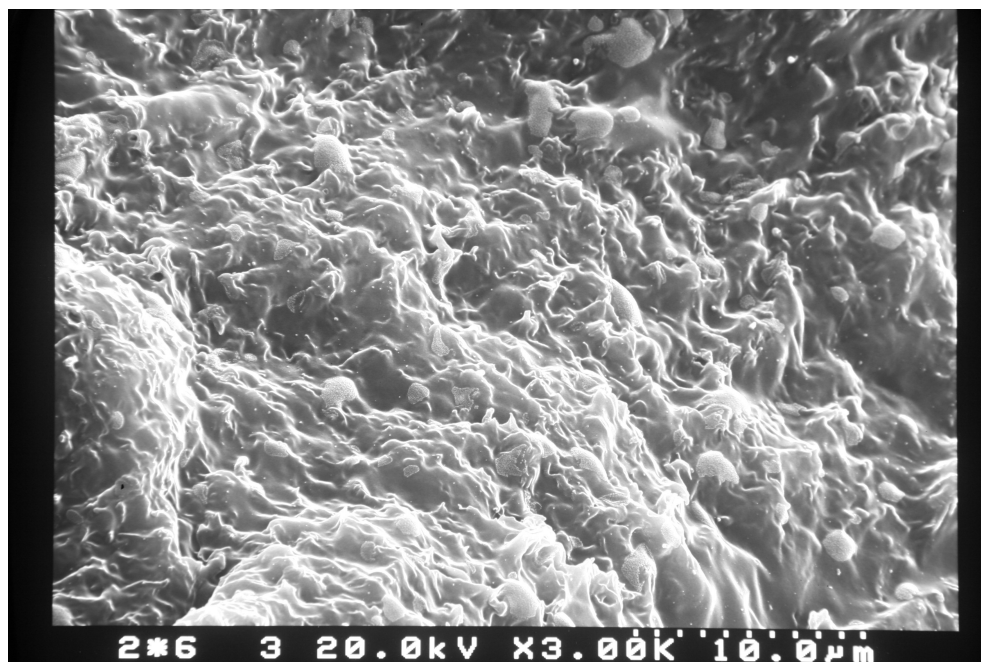


Fig.3-9a SEM 画像 (Ly2-W6)

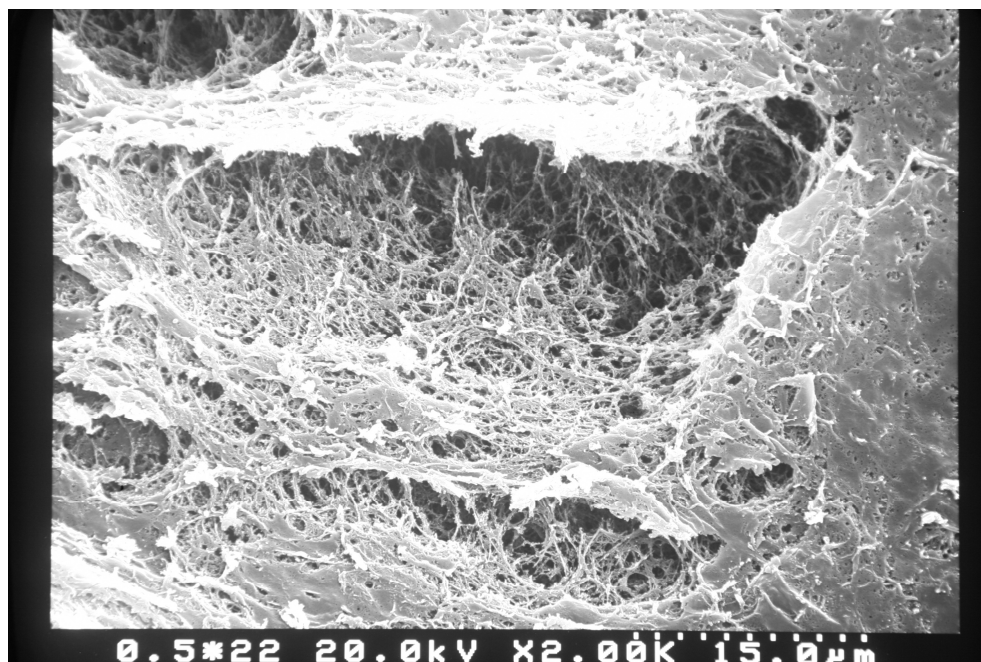


Fig.3-9b SEM 画像 (Ly0.5-W2)

Ly2-W6 の条件の GS-CMG ゲル (Fig.3-9a)、Ly0.5-W2 の条件の GS-CMG ゲル (Fig.3-9b) 共に、ゲルの網目構造が確認できた。また、ゲルの裂け目 (Fig.3-9b 中央部分) ではゲルの切断面より網目構造が明瞭であり、対して、切断面 (Fig.3-9b 右端部分) では密な構造が確認できた。

4. 考察

4-1 二次元培養基材の評価

4-1-1 GS の固定化状態

接触角測定で得られた Fig.3-1a,b,c のグラフについて、GS 濃度が 0.5mg/ml の溶液を用いて、横軸を GS の硫酸化率に、縦軸を接触角においたグラフを Fig.4-1 に示す。

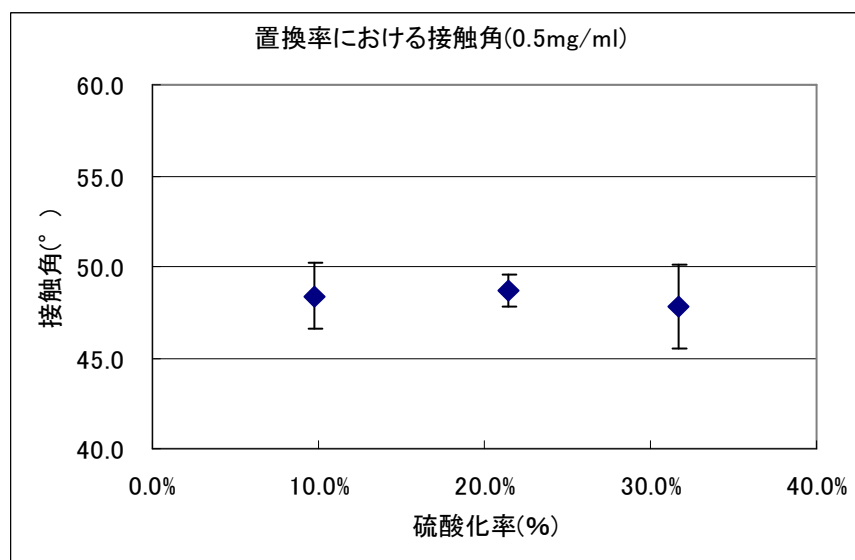


Fig.4-1 置換率における接触角(GS 濃度 0.5mg/ml)

この Fig. から、GS の硫酸化率の変化では接触角は変化しないことがわかる。接触角は表面の濡れ性を示す指標であるので、GS の硫酸化率が変化しても、シャーレ表面の濡れ性は変化しないことがわかった。

このことについて、GS の硫酸化率の上昇は GS の固定化量には関与しないということが考えられる。GS の濡れ性は硫酸化率に伴い上昇するが、接触角として顕著に違いが現れるものではないと考えると、接触角に変化が現れないことは GS の固定化量に差は無いためと考えられる。

また、コロナ放電処理によってコーティングシャーレを作製していることから、GS 以外の溶媒、すなわち水分子もシャーレ表面に固定化されていると考えられる。

これは Fig.3-1a,b,c における GS 濃度 0mg/ml の条件から考えられる。コロナ放電未処理である浮遊培養用シャーレの接触角 (86.6 度) と比較すると、GS 濃度 0mg/ml の条件 (接触角 56.5 度) はコロナ放電処理前より明らかに親水性に変化している。そのため、GS コーティングシャーレには水分子も固定化されていると考えられる。

このことから、コロナ放電処理によって作製できた GS コーティングシャーレの GS の固定化状態は Fig.4-2 のように考えられる。

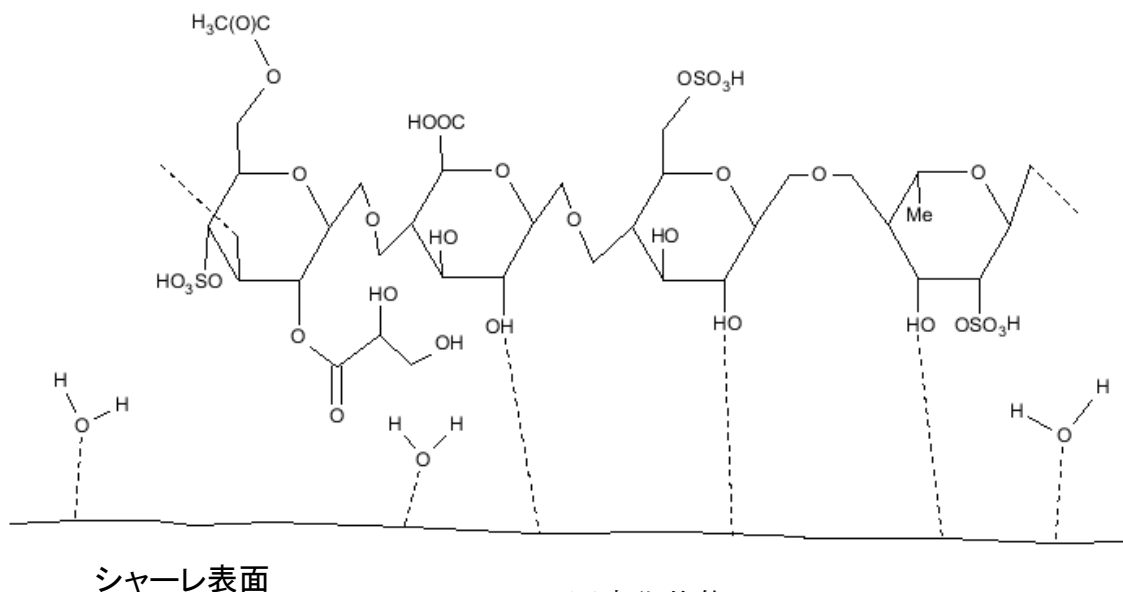


Fig.4-2 GS の固定化状態

まず、コロナ放電処理によってシャーレ表面が活性化し、活性ラジカルが発生する。シャーレ表面に生じたラジカルと、GS の遊離の水酸基に存在する酸素原子上の不対電子が反応・結合し、GS が固定化されていると考えられる。

同様に酸素原子が存在する硫酸基も固定に関与することも考えられる。しかし、硫酸基は溶液中ではイオン化しており、炭素原子に結合しているものを除いた 3 個の酸素原子が共鳴反応を起こしながら存在しているために安定であり、結合に関与しているとは考えにくい。水酸基は炭素原子と結合している構造上、共鳴反応を起こしにくいいため、不対電子が酸素原子上に存在している確率が高いと考えられる。故に、GS のシャーレへの固定には水酸基が用いられていると考えられる。

また、GS は分子量が大きいため、GS 分子鎖同士で立体障害を起こし、分子鎖同士の間が開いた疎の状態では GS は固定化されていると考えられる。GS の固定化は溶液の状態で行っており、固定化反応の系内には GS 分子以外にも水分子が存在している。水分子は GS 分子と比較するとかなり小さいので、GS 分子鎖の間に入り込むことが可能である。そのため、GS 分子鎖の間には水分子が固定されていると考えられる。

また、結合に関与しなかったラジカルについては、ラジカル自体が不安定なため、時間経過によって徐々にそのエネルギーを失っていき、最終的に元のエネルギー状態になり安定すると考えられる。コロナ放電処理を行ってから細胞培養を始めるまでに十分な時間が経過しているため、コロナ放電処理によって生じたラジカルが細胞培養を行うにあたり、細胞へ影響を与えることは無いと考えられる。

4-2 GS の作用について

4-2-1 表現型について

軟骨細胞は *in vitro* で培養を行うと、細胞の形態や産生基質が変化する、脱分化を起こすという報告がある。本節では、GS の作用について考察する前に、先に軟骨細胞の表現型について述べる。

4-2-1-1 軟骨細胞の表現型

軟骨細胞は、*in vivo* の状態と *in vitro* で培養・継代を進めた状態で表現型が異なる。本節では、*in vivo* における軟骨細胞の表現型を「分化型」、*in vitro* で培養を進めた軟骨細胞の表現型を「脱分化型」と定義する (Fig.4-3)。

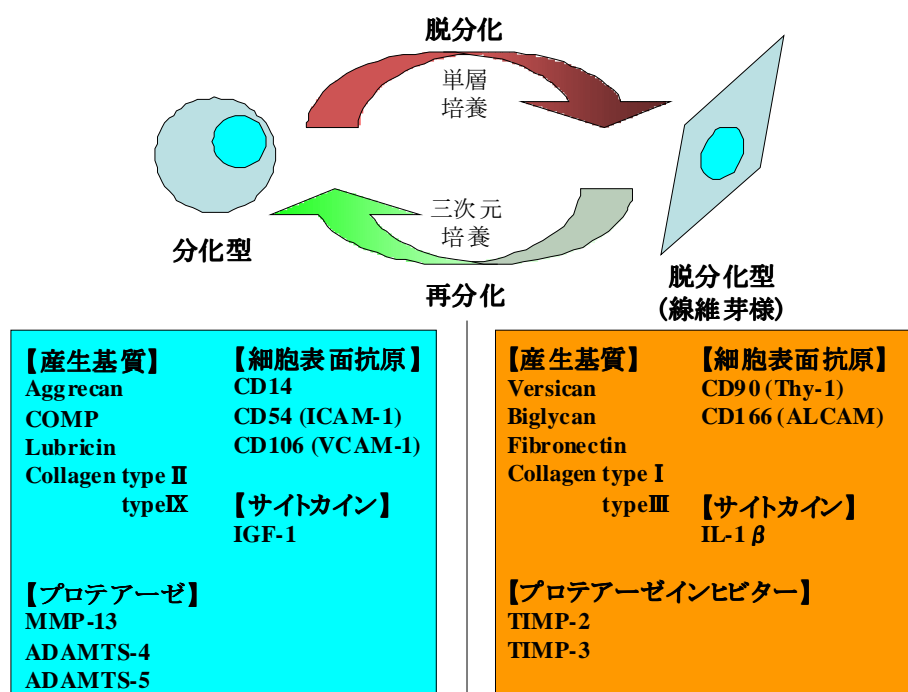


Fig.4-3 軟骨細胞の表現型^[16]

軟骨細胞を再生医療へ用いるためには十分な細胞数の確保が重要であるため、*in vitro* での培養が不可欠である。しかし、軟骨細胞はシャーレなどを用いた単層培養を行うにつれて、細胞の形態が線維芽様へと変化していく。この形態変化に伴い、産生基質はII型コラーゲンやアグリカンなどの硝子軟骨基質から、I型コラーゲンやビグリカン、フィブロネクチンなどの線維軟骨基質へと変化する。また、表面抗原にも変化が現れ、線維芽細胞に特徴的に発現するCD90が発現し始める。この現象が脱分化であり、この表現型が脱分化型である。

脱分化型では硝子軟骨基質を産生しないため、関節軟骨の再生医療に用いることはできない。そこで、脱分化型である軟骨細胞を *in vivo* の状態である分化型に戻す必要がある。脱分化型から分化型へと表現型を戻すことを再分化という。

再分化の方法には幾つか種類があり、主に三次元で培養を行うと再分化するという報告がある^[16]。

1 つ目は高密度ペレット培養である。これは細胞懸濁液を遠沈管などで遠心して細胞ペレットを作製、これを培養するという方法である。この培養法によって軟骨細胞の産生基質は硝子軟骨基質へと変化するが、ペレット内部の細胞に酸素や栄養分が届かず、内部の細胞が死んでしまうという欠点があり、実用的ではないとされている。

2 つ目は三次元足場培養である。これはあらかじめ足場を作製しておき、その足場に細胞を播種・培養するという方法である。細胞を足場内部まで播種・培養する必要があり栄養供給を行うために、多孔質という条件がある。足場材料には主に合成高分子や天然高分子が用いられている。

3 つ目は細胞包埋ゲル培養である。これは含水率の高いゲルによって細胞を包埋し、ゲル内部で培養する方法である。栄養供給・酸素供給が行いやすく、三次元足場培養と同様に様々な材料を用いた研究が行われている。

本研究では細胞包埋ゲル培養に注目しており、軟骨細胞の再分化を促す材料として GS に着目、GS の単層培養における作用について調査した。

4-2-1-2 GS と細胞表現型の関係性

本研究では、軟骨細胞の表現型の調査として表面抗原の調査を行った。分化型のマーカーとして CD14 の発現を調査した。脱分化型のマーカーとして CD90 の発現を調査した。CD14 は単離して 24 時間後の軟骨細胞で発現が確認されており、CD90 は単離して 2 週間培養を行った軟骨細胞や線維芽細胞で発現が確認されている^[17, 18]。

Fig.3-5a,b,c の結果から、脱分化型マーカーである CD90 の発現減少が認められた。しかし、分化型マーカーである CD14 の発現は見られなかった。しかし測定前の GS 添加によって、軟骨細胞は線維芽様から球形への形態変化、及び、細胞塊の形成が見られた(Fig.4-7)。球形の形態は *in vivo* における軟骨細胞の形態であり、細胞塊の形成は先述のペレット培養を連想させる。

軟骨細胞の形態と表現型について、Kumar ら^[19]は、軟骨細胞の Sox9 の転写活性は RhoA シグナルとアクチン重合によって制御される、と報告した。

Sox9 は軟骨細胞の指標とされる遺伝子であり、硝子軟骨基質であるアグリカンや II 型コラーゲンの発現・産生を制御すること、また、幹細胞から軟骨細胞への分化誘導の際の分化マーカーとして知られている^[20-22]。RhoA はアクチンの重合を促し、

細胞骨格であるアクチンフィラメントの形成を促すこと、また、その活性化は細胞の運動機能を司るミオシンの収縮を促し細胞の形態形成に影響を与えることで知られている^[21]。

RhoA が発現している細胞では、Sox9 によって制御されるⅡ型コラーゲンの発現が見られず、その逆も然りである (Fig.4-4)。また、Woods ら^[20]はアクチンフィラメントの形成阻害によって GAG 産生が向上するという報告をしている (Fig.4-5)。

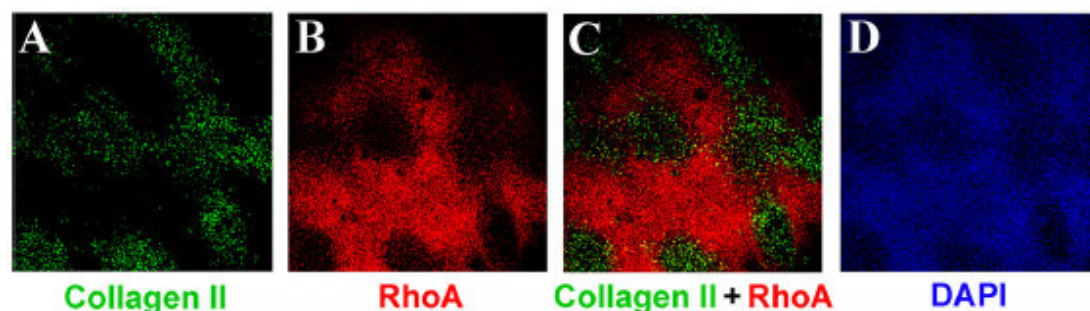


Fig.4-4 Ⅱ型コラーゲン発現と RhoA 発現の関連性^[19]

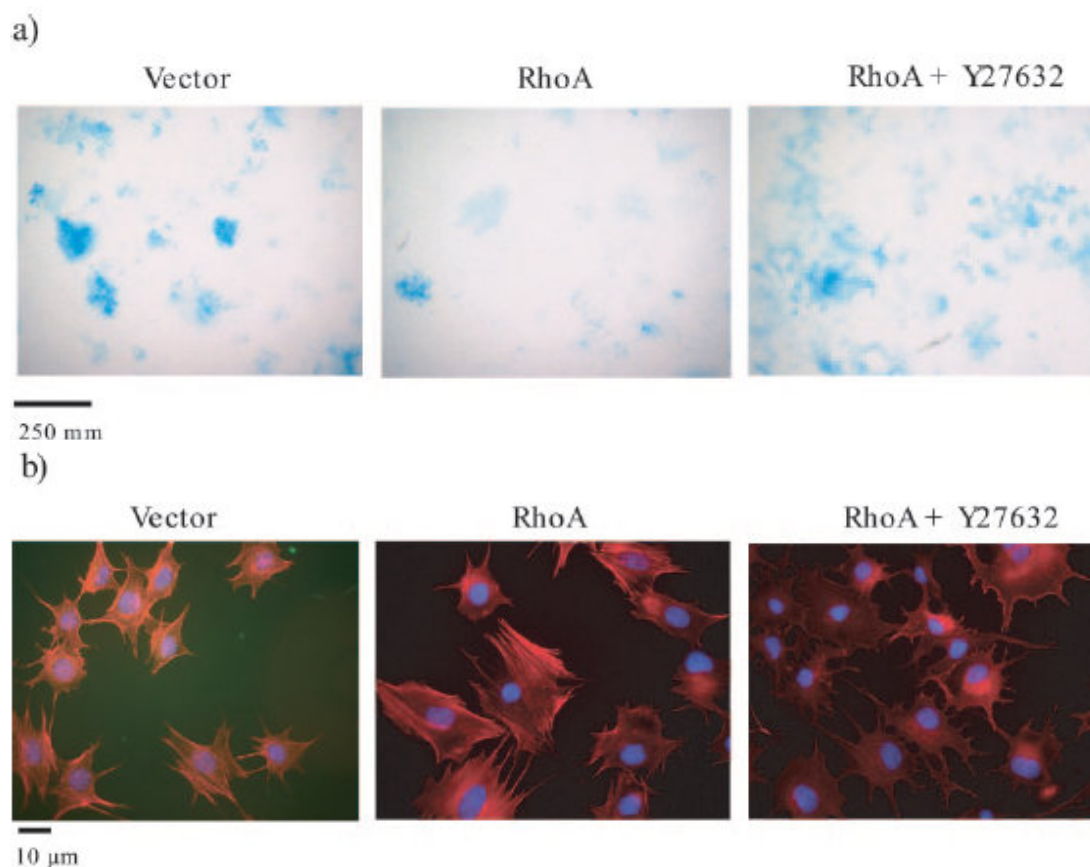


Fig.4-5 RhoA 発現と Rock 阻害における GAG 産生への影響^[20]

(a)アルシアンブルー染色 (b)ローダミン・ファロイジン染色

Y27632 : Rock inhibitor

これらのことから、軟骨細胞は細胞形態、特に RhoA 発現とアクチンフィラメントの形成によって表現型が制御されていると言える。

また、Panda ら^[23]は、不死化軟骨細胞の形態への Sox9 の影響を報告した (Fig.4-6)。

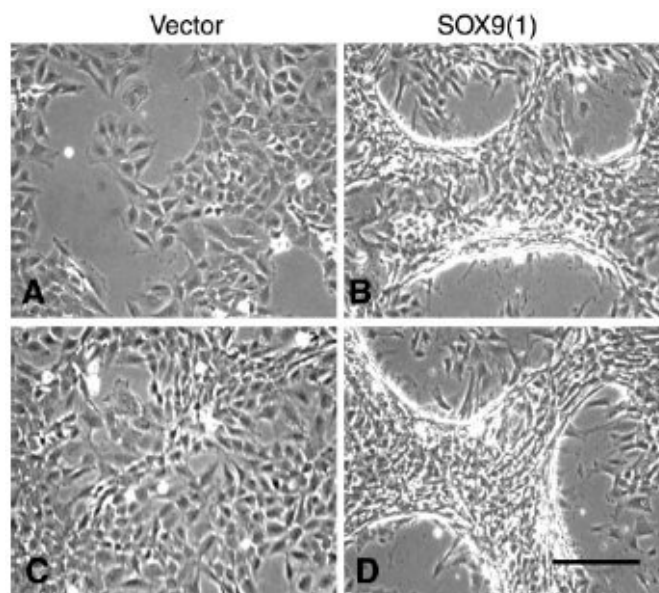


Fig.4-6 Sox9 発現による細胞形態への影響^[23] scale bar = 100 μ m

Sox9 発現細胞の形態は、GS 添加を行なった軟骨細胞と類似している (Fig.4-7)。

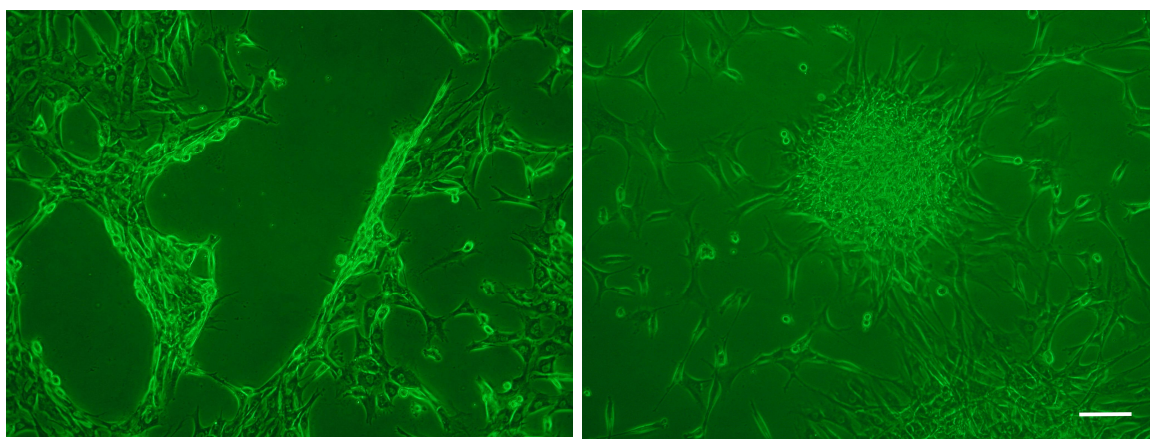


Fig.4-7 GS 添加による細胞形態変化 (左:培養 10 日、右:培養 14 日)
100 μ g/ml GS (12.5%) / 10% FBS / DMEM 使用 scale bar = 100 μ m

Fig.4-6 (B) (D) と Fig.4-7 の細胞形態の類似性は明白であり、GS 添加によって軟骨細胞は Sox9 を発現している可能性が考えられる。

すなわち、GS は軟骨細胞に対し Sox9 を発現させる、言い換えれば、軟骨細胞の再分化効果がある可能性が考えられる。

Fig.4-8 に現在予想される GS の作用メカニズムについてまとめた。

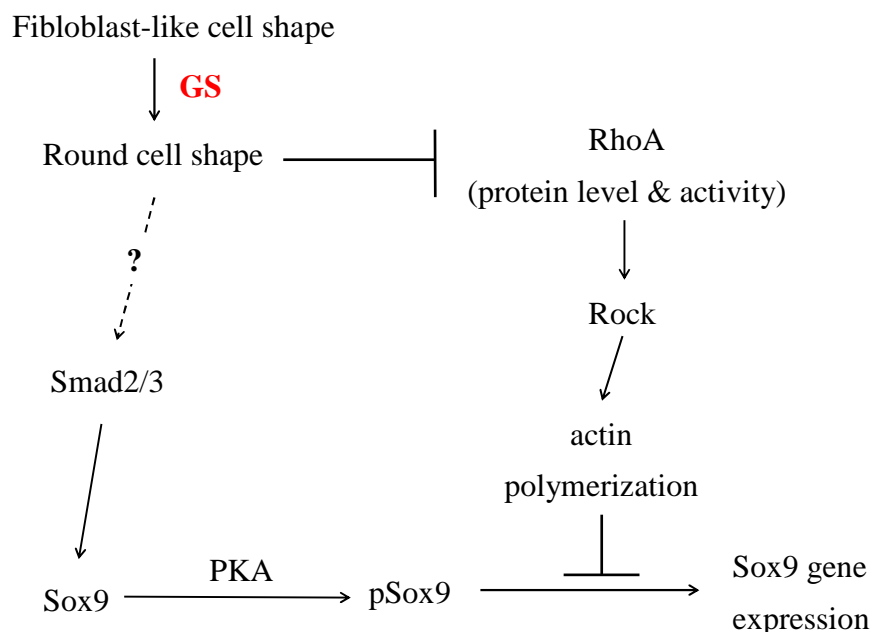


Fig.4-8 GS による軟骨細胞再分化の予想メカニズム^[19]

GS の作用により、軟骨細胞は繊維芽様から球形に形態変化を起こす。形態変化により RhoA の抑制が起こり、アクチン重合 (アクチンフィラメント形成) が抑制される。これにより Sox9 の遺伝子発現が生じ、軟骨細胞の再分化が起こると予想される。

この予想メカニズムを妥当と判断するためには、以下の調査が必要と考えられる。

- ①GS 添加時の軟骨細胞のアクチン形態
- ②GS 添加時の RhoA 活性と Rock , Sox9 遺伝子発現との関連性
- ③GS と細胞形態、Smad2/3 (Sox9 の上流シグナル分子) との関連性

4-2-2 細胞増殖について

Fig.3-3a の結果から、GS コーティングシャーレ上で軟骨細胞の増殖が抑制されるという結果を示した。また、硫酸化率が低い GS のほうが、より抑制的に働いた。

先述の GS 添加による細胞形態の変化と同様に、GS コート上においても球形の形態を示す軟骨細胞が見られた (Fig.4-9)。このことから、GS コーティングシャーレ上でも軟骨細胞は再分化している可能性が考えられる。

Panda ら^[23] は、Sox9 を発現させた不死化軟骨細胞の細胞周期を調査し、G2/M 期の割合が減少したことを報告した (Fig.4-10)。

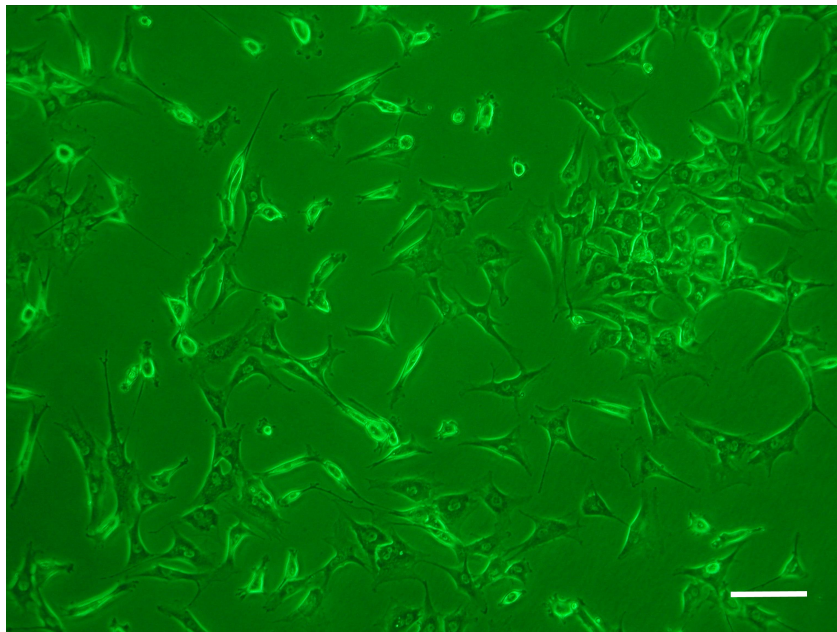


Fig.4-9 GS (12.5%) コートシャーレ上の軟骨細胞
培養 3 日目 scale bar = 100 μ m

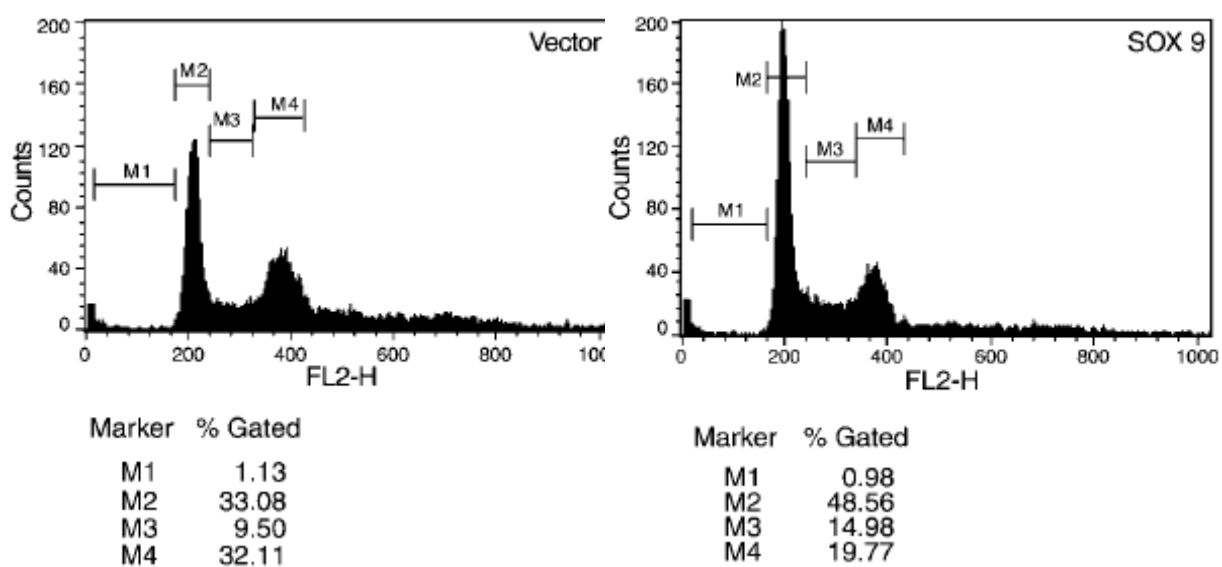


Fig.4-10 Sox9 と細胞周期との関連性^[23]
左:コントロール、右:Sox9 発現

すなわち、Sox9 発現細胞は増殖期から休止期に移行することが考えられる。このことから、GS コーティングシャーレ上で培養した軟骨細胞は、Sox9 発現による細胞周期の休止期への移行によって増殖が抑制されたと考えられる。

4-3 三次元培養担体の評価

本研究ではアミノ酸である Lysine のカルボキシル基がメチルエステルに修飾された、Lysine methyl ester を用いた。

Lysine methyl ester は CMG のカルボキシル基同士を繋ぐ架橋剤として用いている。架橋剤が天然の Lysine であった場合、副反応として Lysine の α 位のカルボキシル基が架橋に用いられる可能性が考えられ、CMG 鎖同士を繋ぐ架橋剤としての役割が果たせないと考えられる。そこで、Lysine の α 位のカルボキシル基への反応を防ぐために、メチルエステルで修飾された Lysine methyl ester を用いた。

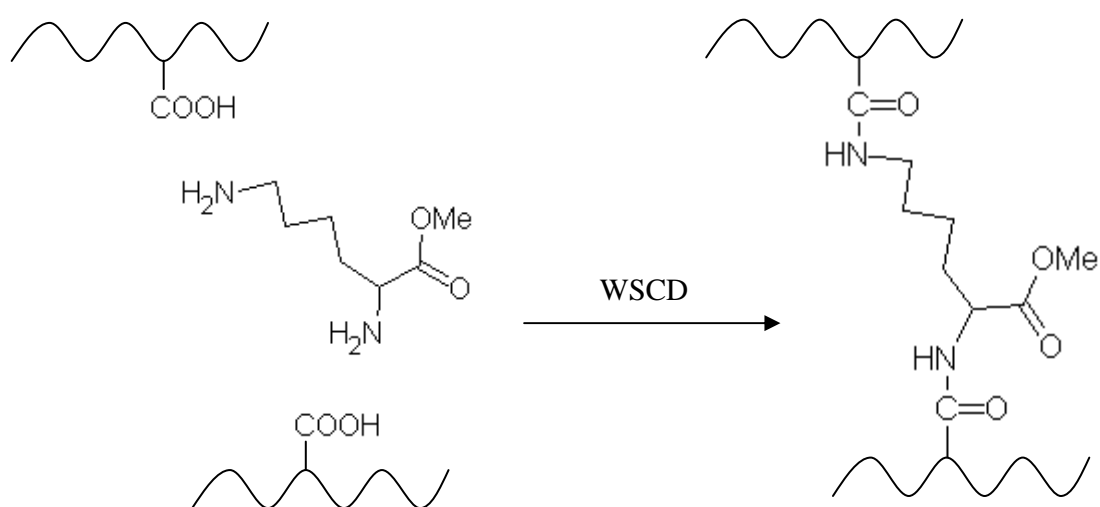


Fig.4-11 Lysine methyl ester を用いた CMG の化学架橋

4-3-1 弾性率について

Fig.3-6a,b の結果から、ゲルの弾性率は Lysine 量、WSCD 量に依存して上昇するという傾向を示した。

Lysine は CMG のカルボキシル基間を架橋するため、量の増加は架橋度の増加となり、弾性率の上昇へと反映されたと考えられる。

WSCD はアミノ基とカルボキシル基を繋ぐ縮合剤として用いている。そのため、量が増加するにつれ架橋度が増加、弾性率の上昇へと反映されたと考えられる。

WSCD 1 倍量でゲルが形成されなかった点、及び、過剰量の添加においても弾性率が上昇した点については、溶媒に培地が用いられていることが原因と考えられる。培地中には色素であるフェノールレッドや添加物であるインスリン、トランスフェリンといったタンパクが含まれている。WSCD を培地に溶解させると培地の色が赤から無色透明に変化することが確認できたため、これらに WSCD が用いられたと考えられる。そのため、WSCD 1 倍量ではゲルが形成されず、過剰量の添加においても弾性率が増加したと考えられる。

4-3-2 膨潤率について

Fig.3-7 の結果から、膨潤率は Lysine、WSCD が増加するに連れて抑制される結果となった。これは Lysine、WSCD の増加と共に架橋度が増加し、CMG 鎖の自由度が制限されるために、膨潤が抑えられたと考えられる。

また、GS-CMG ゲルの膨潤においては、ゲル中からの GS の放出が生じると考えられる。

ゲルを培地中に入れると、ゲルの基質濃度が高いために浸透圧の作用によりゲル内に液体が入り込む。同時に、ゲル内から培地中に出ていく物質も存在すると考えられる。ここで、ゲルの作製において、必ずしも全ての GS が CMG 鎖に固定されるわけではないと考えられるため、ゲルから固定されていない GS が放出される可能性がある。そのため、上述の「ゲル内から培地中に出ていく物質」は GS であると考えられる。

そこで、膨潤培地中に GS が存在するかを確認するために、トルイジンブルー溶液の滴下を試みた。トルイジンブルーは硫酸基と反応して青から紫へ変色するため、本研究室では GS の存在確認に用いられている。膨潤培地にトルイジンブルー溶液を滴下したところ、培地の色である赤から赤紫への変色が確認された。このことから、GS が培地中に放出されたことが分かった。

また、GS がゲルからすべて放出されずゲル中に留まっていることを確認するために、膨潤後のゲルをトルイジンブルーで染色した。染色の結果、ゲルが紫色を帯びた。このことから、ゲル中に GS が残存していること、つまり、GS がゲルに固定化されていることが確認できた。

以上のことから、GS-CMG ゲルの膨潤では固定化されていない GS が放出され、その後は平衡状態に達すると考えられる。

4-3-3 ゲル化時間について

Fig.3-8 の結果から、ゲル化時間は Lysine、WSCD が増加するに連れて短縮される結果となった。WSCD を用いたカルボキシル基とアミノ基とのアミド結合形成は等モル反応である。そのため、Lysine、WSCD の増加は反応頻度の増加と同義であり、ゲル化時間が短縮されたと考えられる。

また、GS-CMG ゲルのゲル化時間が CMG ゲルのものより長い点については、GS が CMG 鎖同士の架橋を阻害したためと考えられる。GS の固定化には CMG と同様にカルボキシル基が使われていると考えられるため、GS の固定化に Lysine と WSCD が使われ、ゲル化時間に影響したと考えられる。

4-3-4 ゲル微細構造について

撮影した CMG ゲルの作製条件は以下の2種類である。

- CMG 20wt% , Lysine×2 , WSCD×6 , GS (31.9%) 5wt% ……以下 Ly2-W6
- CMG 20wt% , Lysine×0.5 , WSCD×2 , GS (31.9%) 5wt% ……以下 Ly0.5-W2

この2種類のゲルは弾性率で最も差が見られたゲルであり、微細構造に明らかな違いが現れるのではないかと考え、測定に用いた。

Ly2-W6 : 409.5kPa Ly0.5-W2 : 128.4kPa (Table.3-2 より)

しかし、Fig.3-9a,b からでは、明確な違いは見当たらなかった。

そこで、弾性率ではなく、膨潤率(Fig.3-7)とゲル化時間(Fig.3-8)に注目した。膨潤率、ゲル化時間の両方で、Ly0.5-W2 ではなく Ly1-W2 のほうが、架橋度が低い可能性が考えられた。Ly1-W2 のゲルならば微細構造の違いが得られるのではないかと考えられる。

5. 結論

以下、本研究で得られた結論を記載する。

GS の機能について、硫酸化率の違いにより

①軟骨細胞増殖抑制効果

②軟骨細胞に対する再分化効果の可能性

が判明した。

また、GS、CMG を用いた軟骨細胞の二次元足場培養、及び、三次元細胞包埋足場培養の培養法を確立した。

謝辞

本研究を行うにあたり御指導を頂きました堀内孝教授、宮本啓一准教授、後輩の皆様、この場をお借りして感謝の礼を申し上げます。

堀内教授には、細胞研究を中心に様々な御助言を頂き、深く感謝しております。宮本准教授には、実験を中心に大変御世話になりました。研究方針に対しての御助言・御指導、研究目標へのアプローチのかけ方など、様々な面から学ばせていただき、深く感謝しております。事務官の村上節子さんには、研究生活全般におきましてお世話になりました。

ジェランチームとして共にジェラン研究に挑んで参りました M2 の山本さん、M1 の丹羽さん、B4 の小山さん方とは、実験についての議論を交わす等、有意義で密度の濃い関係を築くことが出来ました。今後もこのような関係が代々受け継がれていきます様、日々祈っております。

M1、B4 の後輩方には研究生活においてお世話になりました。至らない点多々ありましたが、ご容赦願います。皆様の今後の御活躍をお祈り申し上げます。

また、ESCA の測定指導をして頂いた技術部の田村さん、FACS の技術相談をして頂いた近田さんと登川さんにもお世話になりました。そして、第一合同棟を清掃して下さいっている方々にも、快適な生活をお送りすることが出来たことに対し、感謝しております。

最後に、経済的・精神的に支えて下さった両親へ感謝の意を示し、私の謝辞とさせていただきます。

参考文献

- 1) 井上 和彦:関節の痛みがよくわかる本／小学館(1999)
- 2) 井上 和彦:新・ひざの痛い人が読む本「変形性膝関節症」痛み解消 Q&A／講談社(2006)
- 3) 「今後の調査研究の在り方について」平成 19 年 8 月 介護予防の推進に向けた運動器疾患対策に関する検討会
- 4) 健康が一番 本館、あなたの健康をサポートします！
(<http://www.hyper-tsukumi.jp/~info-k1/index.html>)
- 5) 人体組織ミュージアム frame
(<http://anatchb.dept.med.gunma-u.ac.jp/~anat1his/index1.htm>)
- 6) Cartilage tissue engineering and bioreactor systems for the cultivation and stimulation of chondrocytes / *Eur Biophys J* (2007) 36:539-568.
- 7) 入村達郎 編:糖鎖と細胞 細胞認識と細胞交通を担う生体分子／日経サイエンス社(1994)
- 8) 園田雄久, 平成 21 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 組織再生を誘導する硫酸化ネイティブジェランの調製
- 9) 「FFI Reports ジェランガムの基礎と食品への応用」三栄源エフ・エフ・アイ株式会社
- 10) 長尾達郎, 平成 18 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 組織修復をコントロールする生体材料の開発
- 11) 清水康治, 平成 20 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 組織修復材料としてのジェラン
- 12) 「組織修復・再生を促進する機能性生体材料の開発」平成20年6月 三重大学 當麻直樹／独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構平成19年度 産業技術研究助成事業研究成果報告書
- 13) Distribution and role of tenascin-C in human osteoarthritic cartilage /
J Orthop Sci (2010) 15 : 666-673.
- 14) 松林通, 平成 8 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 高置換カルボキシメチルジェランの調製
- 15) 伊藤寛之, 平成 22 年度三重大学大学院工学研究科分子素材工学専攻修士論文, 椎間板軟骨再生用材料の開発
- 16) Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair / *Ann Anat* 191 (2009) 325-338.

- 17) Immunophenotypic Analysis of Human Articular Chondrocytes: Changes in Surface Markers Associated With Cell Expansion in Monolayer Culture /
J. Cell. Physiol. 202: 731-742 (2005)
- 18) Immunophenotypic Changes of Human Articular Chondrocytes During Monolayer Culture Reflect Bona Fide Dedifferentiation Rather Than Amplification of Progenitor Cells / *J. Cell. Physiol.* 214: 75-83 (2008)
- 19) The Transcriptional Activity of Sox9 in Chondrocytes Is Regulated by RhoA Signaling and Actin Polymerization / *Mol. Cell. Biol.* 2009, 29 (15): 4262.
- 20) RhoA/ROCK Signaling Regulates Sox9 Expression and Actin Organization during Chondrogenesis / *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol.280, No.12, March 25, pp. 11626-11634, 2005.
- 21) Regulation of Chondrocytes Dedifferentiation by the Actin Cytoskeleton and Adhesive Interactions / *J. Cell. Physiol.* 213: 1-8, 2007.
- 22) Rho Kinase-Dependent Activation of SOX9 in chondrocytes / *ARTHRITIS & RHEUMATISM* Vol.62, No.1, January 2010, pp. 191-200.
- 23) The Transcription Factor SOX9 Regulates Cell Cycle and Differentiation Genes in Chondrocytic CFK2 Cells / *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* Vol.276, No.44, November 2, pp. 41229-41236, 2001.

8. 付録

8-1 培地、試薬の調製

【試薬・器具・機器】

- high-glucose DMEM (D-6429/Sigma)
- Penicillin-Streptomycin Solution(PS) (P-0781/Sigma)
- L-Glutamine(LG) (G-7513/Sigma)
- Fetal bovine serum (FBS)
- Trypsin-EDTA solution(10x) (T-4174/Sigma)
- ITS+ Premix (354352/Becton Dickinson)
- L(+)-アスコルビン酸 (Wako)
- 孔径 0.22 μ m フィルター(Millex-GV) (SLGV025LS/MILLIPORE)
- Stericup フィルターユニット (SCGVU05RE/MILLIPORE)
- 恒温槽

8-1-1 培地調製

- ①凍結保存している PS 5ml を恒温槽に入れ解凍した。
- ②LG 5ml に PS を添加、これをシリンジで吸引しフィルター滅菌を行い、DMEM 500ml に添加した。
- ③ITS+ Premix 5ml を同様にフィルター滅菌し、DMEM に添加した。
- ④アスコルビン酸を 18.75mg 秤量し少量分取した DMEM に溶解、同様にフィルター滅菌し、DMEM に添加した。
- ⑤調製した DMEM を 4℃で保存した。

8-1-2 各溶液の調製

【FBS の不活性化、分注、保存】

- ①37℃の温水で解凍後、数回振り、55～56℃の温水で時折振り混ぜながら 30 分加温した(不活性化)。
- ②Stericup フィルターユニットでフィルター滅菌を行い、50ml アシストチューブに 25ml ずつ分注した。
- ③分注後の溶液を－20℃で保存した。

【Trypsin-EDTA solution(10x)】

37℃の温水で解凍後 5ml アシストチューブに 4ml ずつ分注し、－20℃で保存した。

* 以下、Trypsin と表記する。

【滅菌水の作製】

- ①脱イオン水を 1L メディウムビンに入れた。
- ②蓋を閉め滅菌テープで封印し、121℃/40min にて高圧蒸気滅菌を行った。

8-2 細胞培養

【試薬・器具・機器】

- ・正常ヒト膝関節軟骨細胞 (当研究室で冷凍保存されていたもの)
(CC-2550/Takara Bio)
- ・調製した DMEM (8-1-1 参照)
- ・Phosphate Buffered Saline(PBS)
- ・Fetal bovine serum(FBS) (EQUITCH-BIO)
- ・Trypsin (T-4174/Sigma)
- ・各種培養フラスコ (住友ベークライト)
- ・各種遠沈管 (住友ベークライト)
- ・血球計算盤
- ・CO₂ インキュベーター (池本理化工業)
- ・遠心機
- ・恒温槽

8-2-1 細胞の解凍

- ①培養フラスコに 10%FBS/DMEM を 4ml/25cm² フラスコ(14ml/75cm² フラスコ)を入れ、37℃/5%CO₂ インキュベーター内でプレインキュベートした。
- ②－80℃で凍結保存されていた軟骨細胞の 5ml アシストチューブを 37℃の温水で解凍した。この際、僅かに氷が残る程度に解凍を抑え、残る氷は室温で解凍した。
- ③解凍した細胞懸濁液を調製した培地 14ml に加え攪拌した。
- ④攪拌後、750rpm/5min 遠心分離した。
- ⑤上清を除去後、調整した培地 1ml で懸濁し、プレインキュベートしておいたフラスコに播種した。

8-2-2 培地交換

- ①交換用の培地(10%FBS/DMEM)を 37℃の温水で温めた。
- ②滅菌済み 10ml ピペットで細胞培養培地を吸引、廃棄した。
- ③各細胞培養容器に対する適量の培地を加えた。

8-2-3 継代培養

【準備】

- ①10%FBS/DMEM、滅菌済み PBS を適量用意した。
- ②冷凍保存してある Trypsin を解凍し、10% Trypsin/PBS を適量用意した(以下、トリプシン溶液)。
- ③継代先の培養フラスコに 10%FBS/DMEM を 5ml/25cm²フラスコ(15ml/75cm²フラスコ)を入れ、37℃/5%CO₂ インキュベーター内でプレインキュベートした。

【細胞の洗浄、剥離】

- ①培養フラスコの蓋を開け、口元を加熱殺菌した。
- ②滅菌済み 10ml ピペットを加熱滅菌後に培養フラスコ内に挿入し、培養液を吸引、廃棄した。
- ③PBS を 5ml/25cm²フラスコ(10ml/75cm²フラスコ)を入れ、フラスコ内を洗浄した。
- ④洗浄液を吸引、廃棄し、トリプシン溶液を 5ml/25cm²フラスコ(10ml/75cm²フラスコ)を入れ、37℃/5%CO₂ インキュベーター内で 5 分程度インキュベートした。
- ⑤培養フラスコを揺らす又は叩くことで、フラスコから細胞を剥離させた。
- ⑥顕微鏡で細胞が剥離したことを確認後、FBS を 1ml/25cm²フラスコ(2ml/75cm²フラスコ)を加えた。
- ⑦滅菌済み 10ml ピペットで培養フラスコ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠沈管に入れた。
- ⑧遠心機で 750rpm/5min 遠心分離した。
- ⑨上澄みをピペットで吸引、廃棄し、遠沈管に沈殿している細胞に DMEM を 1ml 又は 3ml 加えピペッティングを行い、細胞懸濁液を作成した。

【細胞の播種】

- ①細胞懸濁液濃度を決定した。
血球計算盤にカバーガラスを載せ隙間に細胞懸濁液 7μl を注入、顕微鏡で細胞数を測定し算出した。1mm²の面積の細胞数を数え、液の厚みを 0.1mm としたときの細胞懸濁液濃度を(測定細胞数)×10⁴cells/ml とした。
- ②細胞懸濁液を適量取り、プレインキュベートしておいた培養フラスコに播種、37℃/5%CO₂ インキュベーター内で培養した。正常ヒト膝関節軟骨細胞の最適播種密度は 10,000cells/cm²である。

8-3 GS コーティングシャーレの作製

生体細胞は、接着するための足場を必要とする接着細胞と、接着なしに浮遊したまま培養可能な浮遊細胞に分類される。接着細胞は細胞外マトリックス(ECM)に接着することで初めて分化・増殖などの機能を果たすため、接着細胞の ECM 上での解析を行う必要がある。

今回は、ECM の一種であるグリコサミノグリカンと類似した構造を持つ硫酸化ネイティブジェラン(GS)の細胞応答を二次元培養で見るために、細胞接着・タンパク吸着のできない浮遊細胞培養用シャーレ表面にコロナ放電処理を行った後 GS をコーティングすることで、GS のみの表面を持つシャーレを作製した。

【コロナ放電処理の原理】

シリコン、ポリプロピレン、ポリエチレンなどは表面層に極性基を持たないため、接着性、コーティング性、親水性が悪いなどの問題があり、表面改質の必要がある。コロナ放電表面処理装置は、高周波高電圧を利用して大気中にコロナ放電を発生させ、それを物質表面に照射することで物質の表面改質を行う装置である。高周波高電圧の気中では、電解内で起こる原子・分子などの衝突により、励起や光子の放出が起こる。この様に生じたエネルギーを物質表面で作用させたとき、その表面のエネルギーが高くなり活性化された状態になる。そこに空気中の酸素や水分子などが反応し、極性を持つさまざまな官能基の形成により、表面の濡れ性が向上する。

【試薬・器具・機器】

- ・GS-1 (S:9.8%)
 - ・GS-34 (S:21.5%)
 - ・GS-24 (S:31.7%)
 - ・GS-40 (S:12.5%)
 - ・GS-36 (S:31.0%)
- } 本研究室で調製
- ・フリー化ネイティブジェラン(F-NG)
 - ・滅菌水
 - ・PBS
 - ・浮遊培養用 Φ 35 シャーレ (MS-80240/住友ベークライト)
 - ・0.22μm フィルター (SVGSB1010/ステリベックス)
 - ・Corona Fit (CFG-500/信光電気計装株式会社)
 - ・接触角測定器

8-3-1 GS 溶液、NG 溶液の調製

【GS 溶液】

- ①各種 GS を 35mg 秤量し滅菌水 14ml に溶解、フィルター滅菌を行い、2.5mg/ml を調製した。
- ②①から 2ml 分取し、滅菌水を 8ml 加え 5 倍希釈、0.5mg/ml を調製した。
- ③①から 1ml 分取し、滅菌水を 9ml 加え 10 倍希釈、0.25mg/ml を調製した。

【NG 溶液】

- ①F-NG 50mg を秤量し滅菌水 40ml に添加した(1.25mg/ml)。
 - ②①から 4ml 分取し、滅菌水を 16ml 加え 5 倍希釈、これを 70℃以上に加熱・溶解させてからフィルター滅菌を行い、0.25mg/ml を調製した。
- *F-NG は本研究室で調製されたものを使用。

8-3-2 細胞培養用コーティングシャーレの作製

- ①浮遊培養用 Φ35 シャーレ表面に 1 分間コロナ放電処理を行った。
- ②調製した GS 溶液(NG 溶液)を 1.5ml 添加し、4℃で 5 時間静置した。
- ③コーティング溶液を吸引後、PBS 1ml で軽く洗浄した。

8-3-3 接触角測定用コーティングシャーレの作製

- ①浮遊培養用 Φ35 シャーレ表面に 1 分間コロナ放電処理を行った。
- ②調製した GS 溶液を 1.5ml(滅菌水は 3ml)添加し、4℃で 5 時間静置した。
- ③コーティング溶液を吸引後、脱イオン水で 2 回洗浄、20 時間風乾させた。

8-4 接触角測定

接触角とは、固相表面に液滴を垂らしたときの接触部分がつくる角度で表され、「固相表面のぬれ」を表す指標として、あらゆる産業分野において表面評価手法として採用されている。接触角が大きい場合は濡れ性が悪く疎水性の表面、小さい場合は濡れ性が良く親水性の表面といえる。

当研究室では、試料表面に置かれた液滴と試料との接液部分の角度を測定する「液滴法」を採用している。

【試薬・器具・機器】

- ・接触角測定用コーティングシャーレ
- ・脱イオン水
- ・接触角測定器

【操作】

- ①コーティングシャーレを接触角測定器に置き、脱イオン水 5 μ l をシャーレ表面に静かに載せるように置いた。
- ②液滴の接触角を測定した。
- ③シャーレ 1 個に対し、①②の操作を無作為に 8 回繰り返した。

8-5 細胞増殖試験

【試薬・器具・機器】

- DMEM (8-1-1 参照)
- Phosphate Buffered Saline(PBS)
- Fetal bovine serum(FBS) (EQUITCH-BIO)
- Trypsin (T-4174/Sigma)
- 細胞培養用コーティングシャーレ (8-3-2 参照)
- 血球計算盤

【準備】【細胞の洗浄、剥離】【細胞の播種】

8-2-3 同項目 参照

【細胞数計測】

- ①シャーレ中の培養液を吸引、廃棄した。
- ②PBS を 1ml 入れシャーレ内を洗浄後、PBS を吸引、廃棄した。
- ③シャーレにトリプシン溶液を 1ml 入れ、37°C/5%CO₂ インキュベーター内で 5 分程度インキュベートした。
- ④シャーレを揺らす又は叩くことで、シャーレから細胞を剥離させた。
- ⑤顕微鏡で細胞が剥離したことを確認後、FBS を 100μl 加えた。
- ⑥シャーレ内の細胞懸濁液を吸引し、15ml 遠沈管に入れた。
- ⑦遠心機で 750rpm/5min 遠心分離した。
- ⑧上澄みをピペットで吸引、廃棄し、遠沈管に沈殿している細胞に DMEM を 1ml 加えピペッティングを行い、細胞懸濁液を作成した。
- ⑨細胞懸濁液濃度を求め、細胞数を算出した。

8-6 GS 添加による形態変化調査

【試薬・器具・機器】

- DMEM (8-1-1 参照)
 - Phosphate Buffered Saline(PBS)
 - Fetal bovine serum(FBS) (EQUITCH-BIO)
 - Trypsin (T-4174/Sigma)
 - 接着培養用 Φ 35 シャーレ (住友ベークライト)
 - カメラ
 - G.S-36 (S:31.0%)
 - G.S-40 (S:12.5%)
 - G.S-48 (S:14.83%)
- } 本研究室で調製

【GS 培地の調製】

- ①各 GS 3mg を DMEM 2.7ml に溶解させた。
 - ②調製した培地を、孔径 0.22μm のフィルターを用いて濾過滅菌を行った。
 - ③この溶液を Table.8-1 のように希釈を行い、GS 濃度 100μg/ml, 10μg/ml, 1μg/ml の GS/10% FBS/DMEM となる GS 培地を調製した。
- 細胞培養では、GS 培地に FBS 濃度が 10%になるように添加して用いた。

Table.8-1 GS 培地の調製

No	1	2	3	4
GS 濃度(μg/ml)	1111	111.1	11.1	1.1
No1 からの分取量(μl)		2000	200	20
添加する DMEM 量(ml)		18	19.8	19.98
残量(ml)	0.48	20	20	20
FBS 添加後の GS 濃度(μg/ml)	1000	100	10	1

【準備】【細胞の洗浄、剥離】【細胞の播種】

8-2-3 同項目 参照

【写真撮影】

所定日に各培地中の細胞を、位相差顕微鏡を用いて写真撮影した。

8-7 Flow Cytometry 解析

【Flow Cytometry の原理】

蛍光染色を施した細胞を浮遊液の状態にして、細い管の中を通過させる。これにレーザー光線を当てると、細胞に当たった光は散乱光と蛍光の2種類の光になる。

散乱光のうち、前方散乱光 (FSC) は相対的な細胞の大きさを、側方散乱光 (SSC) は細胞の内部構造の複雑さを反映する (Fig.8-1)。一方、蛍光は検索対象とした細胞の生物学的特徴 (DNA 量、細胞表面抗原、細胞内抗原など) を反映する (Fig.8-2)。

これらの光は、直進方向あるいは直角方向に設置された検出器により電気的信号に変換、増幅され、オシロスコープ上にサイトグラムあるいはヒストグラムとして表示される。すなわち、顕微鏡を用いることなく、個々の細胞から複数の情報を、同時に、迅速に、かつ客観的に収集することができる。

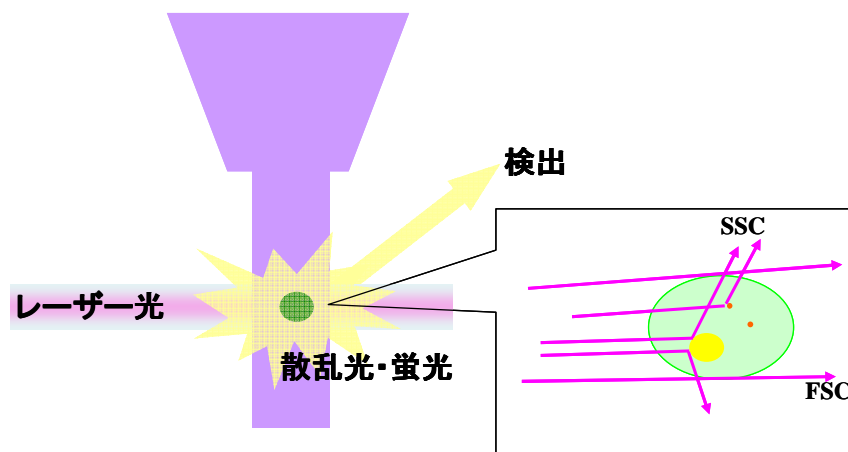


Fig.8-1 Flow Cytometry 原理図

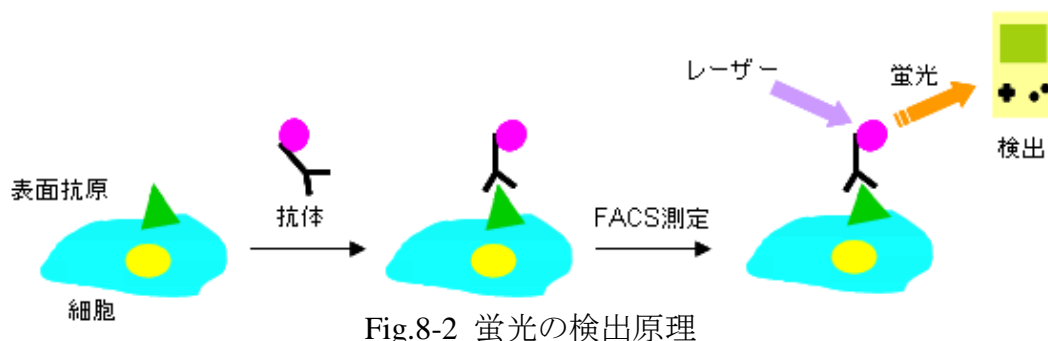


Fig.8-2 蛍光の検出原理

8-7-1 解析準備

【試薬・器具・機器】

- Phosphate Buffered Saline(PBS)
 - Fetal bovine serum(FBS) (EQUITCH-BIO)
 - Trypsin (T-4174/Sigma)
 - FACSCanto II (Becton&Dicknson)
 - セルストレーナー (Becton&Dicknson)
 - anti-human CD90 PE (12-0909-71/eBioscience)
 - anti-human CD14 APC (17-0149-41/ eBioscience)
 - G.S-36 (S:31.0%)
 - G.S-40 (S:12.5%)
 - G.S-48 (S:14.83%)
- } 本研究室で調製

【溶液調製】

2% FBS/PBS 溶液・・・FBS 1ml を PBS 49ml に希釈した。

【手順】

- ①35Φシャーレ中の培地を除去し、PBS で洗浄後、細胞を剥離した。
- ②剥離した細胞に 2% FBS/PBS 2ml を加え洗浄した。その後、1000rpm/5min 遠心分離して上清を除去した。
- ③沈殿した細胞に 2% FBS/PBS 1ml を加え、各抗体を下記のように添加し、4℃で 30 分間、遮光状態でインキュベートした。
 - anti-human CD90 PE ……10μl/sample
 - anti-human CD14 APC・・・2.5μl/sample
- ④静置終了後、1000rpm/5min 遠心分離して上清を除去した後、2% FBS/PBS 3ml を加え洗浄した。
- ⑤1000rpm/5min 遠心分離して上清を除去後、2% FBS/PBS 1ml を加え再懸濁した。
- ⑥これをセルストレーナーに通して測定に用いた。

8-8 三次元培養担体の作製

8-8-1 CMG の調製

【試薬・器具・器械】

- ・脱アシル型ジェラン(DG)(和光純薬)
- ・水酸化ナトリウム (和光純薬)
- ・モノクロロ酢酸ナトリウム (和光純薬)
- ・乳鉢
- ・pH 試験紙
- ・透析チューブ(三光純薬 分子量区画 14,000)
- ・ガラスフィルター
- ・エバポレーター
- ・凍結乾燥機

【50wt%水酸化ナトリウム水溶液の調製】

- ①脱イオン水 100ml に対し水酸化ナトリウム 109g を溶解させた。
溶解熱が発生するので氷浴で冷却しながら溶解させた。
- ②50ml 遠沈管で保存した。

【作製条件】

- ①DG 5g を量り取り乳鉢に入れ、50wt%水酸化ナトリウム水溶液 50ml を添加して、室温で約 1 時間攪拌・膨潤させた。
- ②氷浴上でモノクロロ酢酸ナトリウム 45.15g(OH×5 倍量)を少しずつ添加、均一になるように、粒子が見えなくなるまで攪拌した。
- ③室温で約 2 時間攪拌した。
攪拌から約 1 時間で粘性が強くなり、約 1 時間半くらいから発熱が生じ始めた。
発熱した際には氷浴で冷却しながら攪拌を続けた。
- ④反応物を脱イオン水で溶解・希釈し、透析チューブを用いて透析した。
透析開始から一昼夜は水道水を流しながら透析し、外液が中性になったことを確認後、脱イオン水に交換し 3～4 日ほど透析した。
- ⑤透析内液をガラスフィルターでろ過した。
フィルターの目詰まりが酷い場合は、フィルターろ紙を用いてろ過した後にガラスフィルターでろ過した。
- ⑥エバポレーターで 200ml 程度まで濃縮し、凍結乾燥した。

8-8-2 CMG ゲル、GS-CMG ゲルの作製

【試薬・器具・機器】

- ・CMG (8-8-1 で作製)
- ・GS (本研究室で調製)
- ・EDC:WSCD・HCl (ペプチド研究所)
- ・リジン:L-Lysine Methyl Ester Dihydrochloride (508-56542/Wako)
- ・スパチュラ
- ・シリコン型(直径 12mm)
- ・培地(8-1-1 参照)
- ・PBS (pH 7.4)

【作製条件】

Table.8-1 CMG ゲル、GS-CMG ゲル作製条件

培地 400 μ l			PBS 100 μ l
CMG 量	リジン量	GS 量	EDC 量
100mg (20wt%)	26.4mg ($\times 1$ vs COOH)	25mg (5wt%)	43mg ($\times 2$ vs COOH)

上記の表を基準に条件を割り振った。

【手順】

- ①15ml 遠沈管に CMG とリジン(と GS)を量り取った。
- ②別の 15ml 遠沈管に EDC を量り取った。
- ③①には培地 400 μ l を、②には PBS 100 μ l を入れ、スパチュラを用いて攪拌。溶解させた。それぞれを 1500rpm/1min 遠心した。
- ④EDC 溶液を CMG 溶液に添加し、スパチュラで約 1 分間攪拌、プレゲルとした。
- ⑤直ちにシリコン型に入れ、乾燥を防ぐためにシリコンプレートで蓋をした。
- ⑥一昼夜静置し、CMG ゲル(または GS-CMG ゲル)とした。

8-9 物性評価

8-9-1 弾性率測定

Fig.8-3 の装置を用いて測定した。

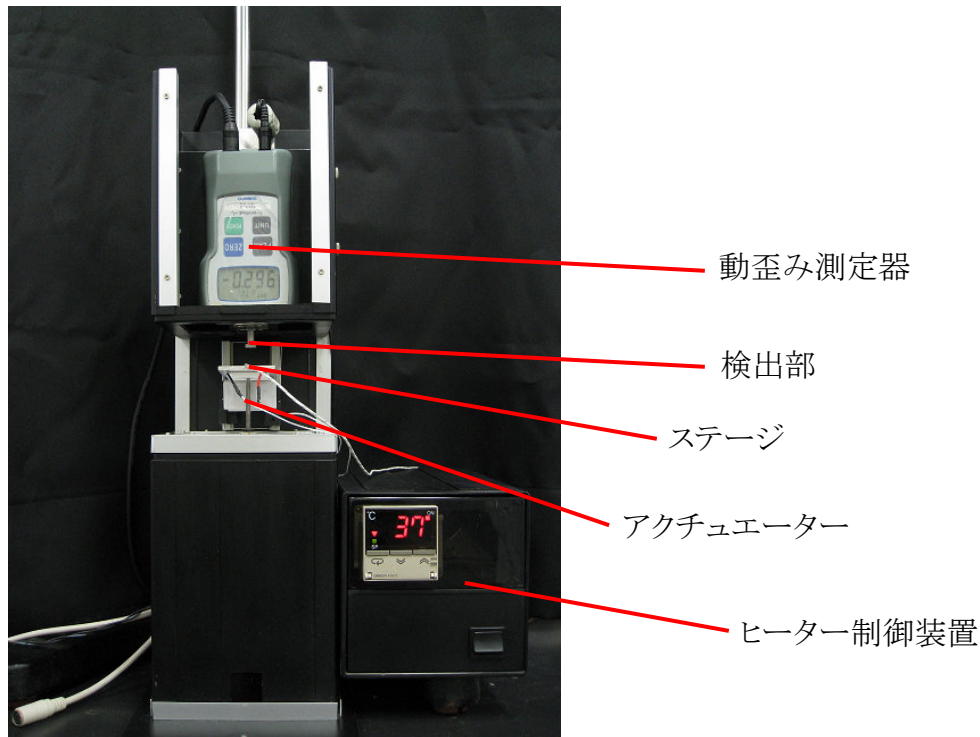
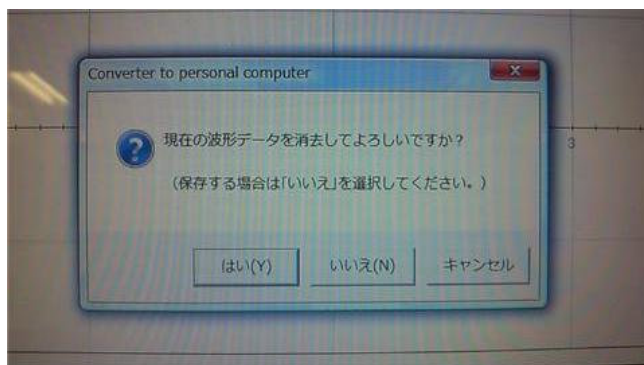


Fig.8-3 圧縮弾性率測定器

【測定操作】

- ①動歪み測定器の POWER を押す。
- ②Excel:ZaberExcelVBstretchmodulus3 を起動する。
- ③[Open Com Port and Renumber]をクリックする。
- ④全アナログ変換測定器を起動する。
- ⑤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]/サンプリング時間[0.1 秒]
- ⑥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。

- ⑦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。
- ⑧Zaberへの[Execute Command Sheet]をクリックする。
- ⑨[OK]を2度クリックする。
- ⑩全アナログへのスタートを押し、下図のウィンドウを出す。



- ⑪⑩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)。
- ⑫サンプルが破断するまで測定を続ける。
- ⑬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。
- ⑭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。
- ⑮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、⑦～⑭の工程を繰り返す。

【解析操作】

- ①Excel: dataを起動し、B列の数値データを、数値が下がり始めるセルの10個上のセルから全てコピーする
- ②Excel: 新 応力-歪曲線を起動し Sheet2 の A 列に①でコピーした数値データを貼り付ける。
- ③Sheet1 の [自然長] 欄に測定した値を mm 単位で入力する。
- ④E 列 [応力 (Pa)] 欄に得られた数値の、プラトーになっている値をグラフのプロット範囲から外す。
- ④近似曲線の傾きを弾性率(Pa)として記録する。

8-9-2 膨潤率測定

【試薬・器具】

- ・CMG ゲル、GS-CMG ゲル(8-8-2 で作製)
- ・メス
- ・24 穴プレート
- ・培地(9-1-1 参照)
- ・ノギス

【手順】

- ①ゲルを、メスを用いて 2mm 角に切断した。
- ②切断したゲルを 24 穴プレートに入れ、培地 1ml を入れた。
- ③所定時間毎にゲルを取り出し、体積を測定した。

8-9-3 ゲル化時間測定

【試薬・器具】

- ・CMG プレゲル、GS-CMG プレゲル(8-8-2 参照)
- ・スパチュラ
- ・シリコン型(直径 12mm)

【手順】

- ①プレゲルをシリコン型に入れた。
- ②所定に時間にプレゲル表面にスパチュラで触れ、プレゲルが付着しなかった時間をゲル化時間とした。

8-10 ESCA

ESCAとはElectron Spectroscopy for Chemical Analysisの略であり、X線光電子分光分析をいう。XPS(X-ray Photoelectron Spectroscopy)ともいわれる。

ESCAは測定試料に軟X線を照射し、放出された光電子の結合エネルギーを測定する方法であり、物質の表面層(1~10nm)の組成元素やその結合状態、表面分子の構造を知ることが出来る。また、イオンエッチングを行うことで組成元素や化学状態の深さ方向の変化を知ることが出来る。

【測定原理】

真空中で試料表面にX線を照射すると、X線のエネルギーに依存して原子内の各軌道の電子と相互作用して、光電子が放出される(Fig.8-4)。この光電子は元素に固有のエネルギー値を有するので、そのエネルギー分布を測定することで試料表面の組成を調べることが出来る。

Fig.8-4について、Work functionとは固体中の電子がFermi levelから真空中に放出されるために必要なエネルギーを示している。通常、ESCAのスペクトルでは、Fermi levelが結合エネルギーゼロと定義されている。

X線源としては、マグネシウムやアルミニウムのK α 特性X線が使用されており、それぞれ1253.6eV、1486.6eVのエネルギーを持つ。

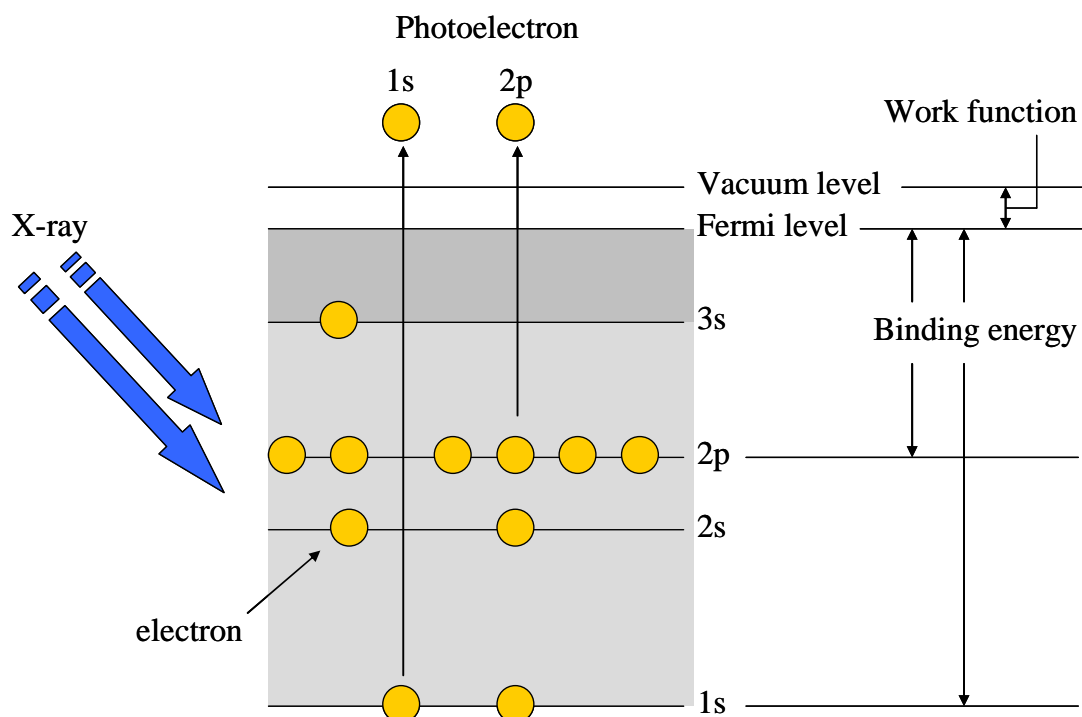


Fig.8-4 ESCAの測定原理

【ESCA から得られる情報】

- ・ピーク位置・・・元素を同定
- ・ピーク強度・・・元素間の相対量
- ・化学シフト・・・化学状態(官能基など)

【測定試料】

- ・面積 10mmΦ、高さ 5mm に収まる固体
- ・水分を含まないもの(真空中で測定するため)

8-10-1 ESCA の使用方法

大まかな測定手順は以下のとおりである。

1. 試料台へ試料を取り付ける
2. 予備排気室へ試料台を導入
3. 測定室に導入
4. 測定条件を設定
5. 分析
6. データ解析
7. 試料を取り出す

【起動】

1. ボンベのバルブが開いているか確認
左から N₂ 0.5MPa、N₂ 0.15MPa、Ar 0.1MPa
2. ION GAGE を ON。(5×10⁻⁶Pa 以下を確認)
3. パソコンを起動させ、起動完了後、本体前面の MAINS スイッチを入れる
4. Vision Manager を起動
5. 本体とPCとの通信チェックが始まる(3分程度)、小ウィンドウが消えたら起動完了

【測定準備】

X 線銃、イオン銃のエージングを行う。1 日の測定の始めに行う。

1. メニューバーから[Window]→[Manual Window]を選択
2. X 線銃のエージング(X ray Gun パネル)
 - ①0mA、2kV にして X ray gun を ON
 - ②真空度が安定するまで待つ→加速電圧を上げる→真空度が安定するまで待つ→・・・と繰り返して 10kV まで電圧を上げる。
 - ③電流も同様に繰り返し、20mA まで上げる。
 - ④10kV、20mA で 5~10 分維持

- ⑤X ray gun を OFF
- 3. イオンがんのエージング(Ion Gun パネル)
 - ①10mA、0.5kV で Ion gun を ON
 - ②真空計が 5×10^{-4} P になっているのを確認
 - ③X 線銃と同様に電圧 UP、その後、電流 UP
 - ④2kV、20mA まで上げて 10 分程度維持
 - ⑤Ion gun を OFF

【サンプルの導入と取り出し】

1. 予備排気—サンプルを予備排気室に入れ真空引きする(10~15 分程度)
 - ①ゲートバルブが閉じていることを確認し、LOAD の LEAK ボタンを 1 回押す(PUMP ランプ消灯)
 - ②LEAK ボタンを数秒押し、予備排気室を大気圧に戻す
 - ③大気圧に戻ったら予備排気室の扉を開ける。
 - ④試料棒のグリップを少し前に出し、サンプルをサンプルフォークにぶら下げる。
 - ⑤グリップを戻し、ロックする
 - ⑥予備排気室の扉を閉め、LOAD の PUMP ボタンを 1 回押す(PUMP ランプ点灯)
 - ⑦真空引きを 10~15 分行う
2. サンプル導入—サンプルを測定室のテーブル上にセットする
 - ①本体試料棒が Home position にあるかを確認
違う場合は[Manual Window]で Home position に移動
 - ②サンプル番号を位置表示ランプで確認
 - ③目視でサンプル導入箇所を確認(サンプルが載っていないか等)
 - ④GATEVALVE の OPEN ボタンを押し、ゲートバルブを開く
 - ⑤グリップのロックを外し、ゆっくり奥に押し込む
 - ⑥[Manual Window]で本体試料棒を etching position の位置に上げる
 - ⑦グリップを戻してロック
 - ⑧GATEVALVE の CLOSE ボタンを押し、ゲートバルブを閉じる
 - ⑨[Manual Window]で本体試料棒を home position の位置に下げる
3. サンプルの取り出し
 - ①予備排気室が真空引きされていることを確認
 - ②取り出したいサンプル番号へ移動
 - ③[Manual Window]で本体試料棒を etching position の位置にし、目視で確認
 - ④GATEVALVE の OPEN ボタンを押し、ゲートバルブを開く

- ⑤グリップのロックを外し、ゆっくり奥に押し込む
- ⑥[Manual Window]で本体試料棒を home position の位置に下げる
- ⑦グリップを予備排気室まで戻してロック
- ⑧GATEVALVE の CLOSE ボタンを押し、ゲートバルブを閉じる
- ⑨ゲートバルブが閉じたことを確認後、予備排気室を大気圧に戻す
- ⑩予備排気室の扉を開け、グリップを少し前に出し、サンプルを取り出す
- ⑫グリップをロックし、予備排気室の扉を閉め、予備排気しておく。

【測定】

1. 初めて使用する場合は、windows のファイル操作で保存先フォルダを作る
Cドライブの Data フォルダに所属研究室ごとにフォルダを作成
フォルダ名は英数のみ、スペース不可(アンダーバーは可)
2. Dataset(データ保存先の設定)
 - ①Dataset をクリックし、Browse をクリック後、データの保存先を決定
 - ②ファイル名を拡張子の前に挿入し、エンターで決定
 - ③ランスペック表示エリアにカーソルを合わせ、マウスホイールをクリック
 - ④■表示が出て登録
3. Acquisition(測定条件の設定)
 - ①Acquisition をクリックし、Anode を選択(Mg or Al)
 - ②X-ray gun の電圧、電流を決定(通常、電圧 2kV、電流 10~20mA)
 - ③Scan Control の部分の Energy Region をクリック
 - ④Region Name の部分に元素名と軌道を入力し、エンターで確定(例:C 1s)
ライブラリにある元素は自動で標準のエネルギー範囲が設定される
Wide scan の場合、Region Name を「wide」と入力
→個々に条件を設定(測定範囲:Mg 1150~0eV、Al 1350~0eV 以内)
 - ⑤ランスペック表示エリアにカーソルを合わせ、マウスホイールをクリック
 - ⑥■が表示され登録される
4. 測定開始
 - ①ランスペックエリアで実行するアイテムを選択(選択アイテムが黒く変化)
カーソルの範囲選択 or Ctrl キーを押しながらアイテムを 1 つずつクリック
 - ②Submit ボタンをクリック(選択した処理が実行)
Manual ランプ点灯時は Resume ボタンを押してから Submit ボタンを押す
[Window]→[Real-Time Display]を選ぶと、測定中のデータが表示

【測定終了】

1. 測定した試料を全て取り出す(10 番の標準 Ag 試料はそのまま)

2. サンプルテーブルを 1 番に移動
3. ゲートバルブが閉じていることを確認
4. Vision Manager を終了
5. 本体前面の MAINS スイッチを切る(消灯)
6. ION GAGE の OFF スイッチを押す
7. パソコンを切る

8-11 SEM

SEM とは Scanning Electron Microscope の略であり、走査型電子顕微鏡をいう。

SEM は測定試料に電子線を絞った電子ビームを照射し、試料から放出される二次電子などを検出することで対象の表面を観察する。広範囲に焦点の合った立体的な像を得る事ができ、観察物の外形を把握しやすい一方、対象の内部に関する情報はほとんど得られない。ただし、試料を凍結破断法などで処理すれば、ある程度の内部観察も可能である。

本論文では、凍結乾燥を行ったサンプルに金スパッタリング処理を施し、撮影に用いている。

8-11-1 SEM 用サンプル準備

【試薬・機器】

- ・サンプル
- ・リン酸バッファー (pH 7.4)
- ・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

【実験操作】

- ① サンプルを適当な大きさに切断した。
- ② リン酸バッファーにサンプルを浸し 10 分間静置して洗浄した。これを 2 回繰り返した。
- ③ 50, 70, 90, 99% EtOH に各 10 分間サンプルを浸し、段階的に脱水を行った。
- ④ 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℃ インキュベーター内で 15 分間静置した。
- ⑤ 99% t-BuOH にサンプルを浸し、37℃ インキュベーター内で 30 分間静置し、置換した。これを 2 回繰り返した。
- ⑥ t-BuOH でサンプルを浸し、冷蔵庫に入れ凍結させた。
- ⑦ t-BuOH 用凍結乾燥機で凍結乾燥を行った。

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。

8-11-2 SEM 関連機材の使用法

＊t-BuOH 用凍結乾燥器

・VFD-21S(Vacuum devise inc.)



- ①後部のトラップコップを水で満たす。
- ②POWER 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。
- ③4℃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、30 分間待つ。
- ④EVAC をオンにして乾燥を開始、サンプル周囲の氷が無くなるまで待つ。サンプル内部までしっかり乾燥させる為、氷が無くなってから 30 分間放置する。
- ⑤30 分後、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。

＊イオンスパッター

・日立イオンスパッターE1010



- ①SEM 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)に番号などを記入し、サンプルの区別が付くようにしておく。
- 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イオンスパッターの MAIN VALVE を開き、台座をセットする。POWER をオンにして、圧力が 10Pa まで下がるのを待つ。
- ⑤圧力が 10Pa になり、Ready のランプが点灯してから 1～2 分待つ。スパッター時間を 120sec に設定し、set を押す。
- ⑥DISCHARGE をオンにして金イオンを飛ばし、スパッタリングを開始する。終了したら POWER をオフにし、試料台を取り出す。

* SEM

・パソコン

・日立走査型電子顕微鏡 S4000



【起動～サンプルセット】

- 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。
- ②displaypower 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。
- ④EVAC 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。

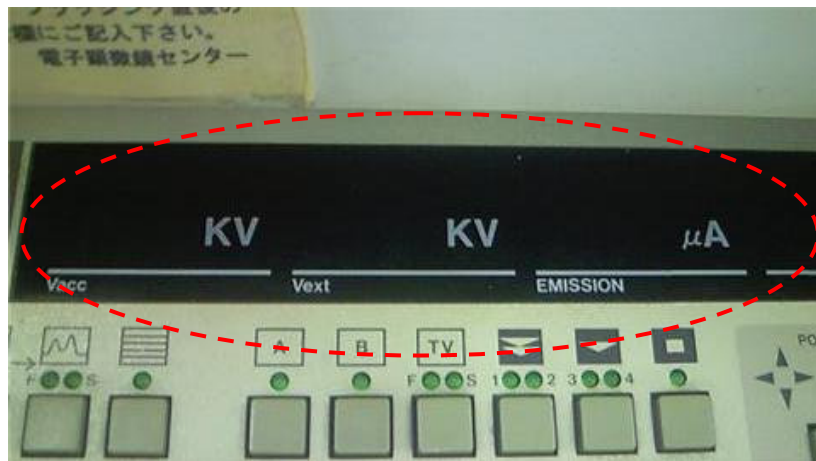
- ⑧緑のランプが点灯し、**high** の位置にある事を確認してから 20 秒ほど待つ。その後レバーを **OPEN** にして、試料を内部試料台に乗せる
- ⑨棒を抜き、前室部分に固定したらレバーを **CLOSE** にする。右下にある **SPECIMENE STAGE** と **AIR LOCK VALVE** のつまみをそれぞれ **LOCK** と **OPEN** にする。

【撮影】

- ①キーボード左上端にある **HV** の **ON** を押す。

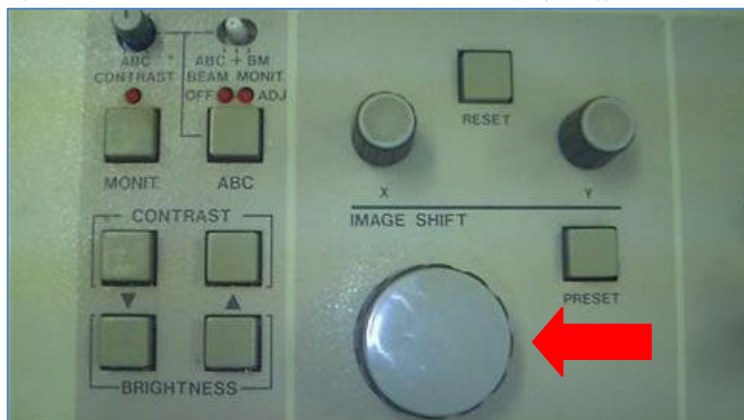


- ②Vacc、Vext、EMISSION の値がそれぞれ安定したら **ABC** を押し、画面のコントラストを合わせる。

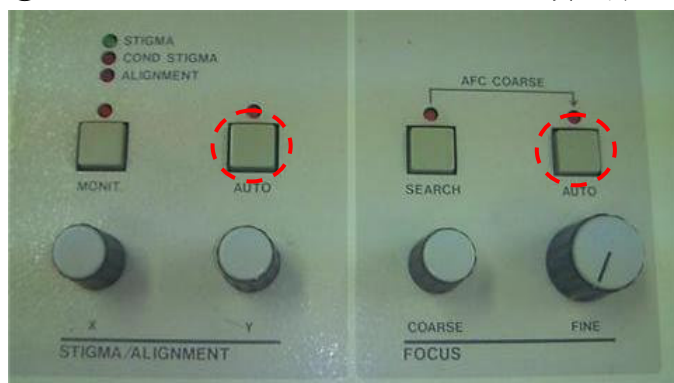


③本体のつまみを回して画像を動かし、サンプルを探す。

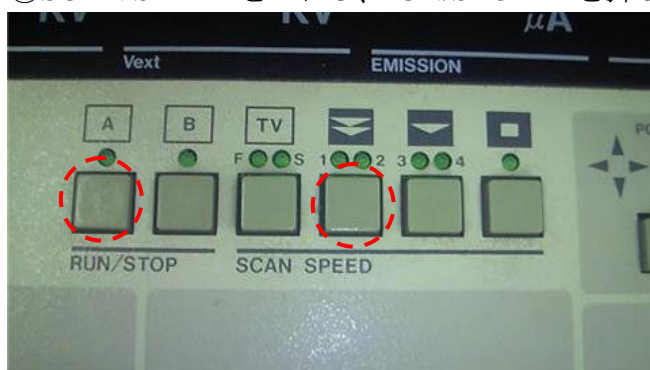
④MAGNIFICATION のつまみを回し、撮影倍率を決定する。



⑤STIGMA: AUTO→FOCUS: AUTO の順で押していき、画像のピントを調整する。



⑥SCAN SPEED を 1 にし、RUN/STOP:A を押して画像を静止画にする。

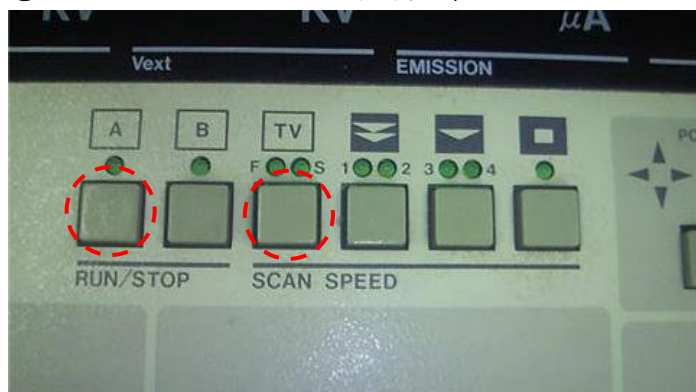


⑦カメラのシャッターを開き、キーボード右上端の PHOTO:DIRECT を押す。



⑧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。

⑨SCAN SPEED:TV を一回押し、RUN/STOP:A を押し撮影を終了する。



* 撮影を続ける場合は②～⑨の工程を繰り返す。

【撮影終了】

①HV 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。



②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。

* サンプルを交換して撮影するときは【起動～サンプルセット】⑥から同様の作業を行う。

③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。