

平成 24 年度 修士論文

弾性組織再生のためのエラスチン・フィブリリン
複合化材料の開発



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

神谷歩

目次

1章:諸言.....1

1-1 再生医療

1-2 弾性組織

1-2-1 弾性を必要とする臓器

1-2-2 弾性線維

1-2-3 エラスチン

1-2-4 フィブリン

1-3 本研究の目的

2章:実験手順.....8

2-1 水溶性エラスチンの抽出

2-2 水溶性フィブリンの抽出

2-3 フィブリンの同定

2-3-1 SDS-PAGE 電気泳動

2-3-2 銀染色

2-3-3 アミノ酸分析

2-4 エラスチンとフィブリンの相互作用

2-4-1 混合溶液の透過光強度測定

2-5 エラスチン・フィブリン複合ゲル作製

2-5-1 フィブリンゲル作製

2-5-2 I型複合ゲル作製

2-5-3 II型複合ゲル作製

2-5-4 III型複合ゲル作製

2-5-5 IV型複合ゲル作製

2-6 複合ゲルの弾性率・伸長率測定

2-7 複合ゲル構造の観察

3章:結果.....21

3-1 水溶性フィブリンの抽出

3-2 フィブリンの同定

3-2-1 SDS-PAGE(銀染色)

3-2-2 アミノ酸分析

3-3 エラスチンとフィブリリンの相互作用

3-4 フィブリリンゲル作製

3-5 複合ゲルの弾性率・伸長率測定

3-5-1 I型複合ゲル

3-5-2 II型複合ゲル

3-5-3 III型複合ゲル

3-5-4 IV型複合ゲル作製

3-6 IV型複合ゲル構造の観察

4章:考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36

- ・ フィブリリンの抽出
- ・ フィブリリンの同定
- ・ エラスチン・フィブリリン間の相互作用
- ・ エラスチン凝集による弾性率への影響
- ・ 架橋剤を両溶液へ添加することによる弾性率への影響
- ・ 架橋剤による弾性率・伸長率への影響
- ・ フィブリリンによるゲル構造への影響
- ・ 今後の展望

5章:結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47

6章:謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・48

7章:参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・49

付録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・50

1章 諸言

1-1 再生医療

様々な臓器、組織が欠損状態や機能不全に陥った場合には、失われた機能を再生するために、人工臓器や臓器移植による治療が行われている。しかし、人工臓器は完全に生体機能を模倣しきれておらず、臓器移植においては拒絶反応やドナー不足などの問題が発生している。

再生医療は細胞を活用することにより、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」・「細胞増殖因子」・「細胞外マトリックス(Extracellular matrix: ECM)」が挙げられ、これらを組み合わせることで、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。(Fig.1-1)¹⁾組織工学ではECMは組織再生に必要な環境を整える役割を担っている。これらはコラーゲンやエラスチンなどの線維性タンパク質、グリコサミノグリカンなどの複合糖質、フィブロネクチンなどの接着タンパク質で構成されている。これらのECMや、他にも人工高分子であるポリグリコール酸(PGA)やポリ乳酸(PLA)を足場材料として、再生させたい組織に合わせて使用する。現状では、こうした材料を用いた再生医療の分野では骨や皮膚などが実用化に至っているが、血管や肺などはまだ実験段階でしかない。そのため、血管や肺などの弾性組織の代替材料が求められている。

人工骨などは一度体内に入れてしまえば骨自体が曲げ伸ばしされることはほとんどなく、十分な硬度を持っていれば使用できる。しかし、血管や肺などは伸び縮みが必要となる組織である。そのため、人工血管や人工肺等を作製する場合には十分な強度を持つこと、伸縮性があること、細胞が培養できる材料であること等多くの要素が求められる。これらを満たす材料として研究されてきたものが、生体由来の材料であるエラスチンである。エラスチンは伸縮性に富み、細胞の培養にも適した材料である。しかし、抽出したエラスチンから作製できる材料には、伸縮性はあるが、生体で存在していた時ほどの強度がないという問題がある。そのため、エラスチンゲル作製方法を改良し、強度も持たせた材料をつくることが求められている。

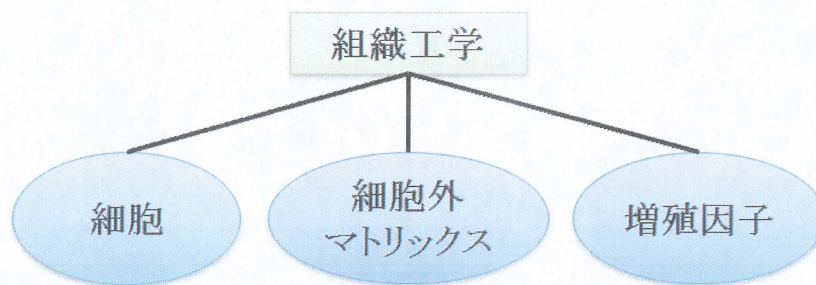


Fig.1-1 組織工学

1-2 弾性組織

1-2-1 弾性を必要とする臓器

人体は多くの組織で構成されている。その中には骨や歯のような硬さを求められる組織もあれば、靱帯や動脈のように柔軟さを求められる組織もある。その中でも柔軟さを求められる組織はその多くがエラスチンを主成分とする弾性線維によって構成されている。また、コラーゲンを主成分とする膠原繊維も同様の組織に存在していることが多く、コラーゲンは硬さ、エラスチンは柔軟さを担っている。その比率によって組織に必要な強度を保っている。(Fig.1-2、Table1-1)

動脈や肺、靱帯などは特に弾性線維が必要とされる組織である。動脈は心臓から送り出される血液の圧力に耐えるために、肺は呼吸のたびに膨らみしぼむ構造を保ち続けるために、靱帯は骨と骨をつなぎ関節を安定させるために弾性線維を必要としている。

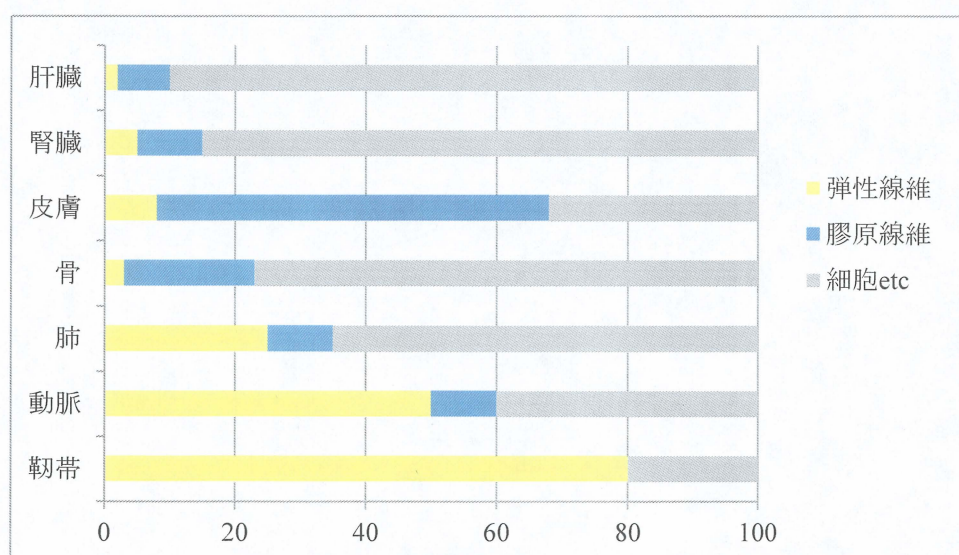


Fig.1-2 体内組成比(乾燥重量比)

Table.1-1 生体組織の弾性率²⁾

	コラーゲン除去処理	弾性率(kPa)	伸長率(%)
豚大動脈(大)	なし	157.9±29.8	200 以上
	あり	109.8±16.1	170±73.5
豚大動脈(小)	なし	508.2±73.4	87 以上
	あり	321.7±36.9	155 以上
牛靱帯	なし	202.5±71.2	135 以上
	あり	197±18.9	159 以上
牛腱	なし	1306.3±340.9	26 以上
	あり	16	172

1-2-2 弾性線維

弾性系線維は主にエラスチンとフィブリリンから構成され、大きく3種類に分類される。(Fig.1-3)エラスチンを全く含まず、フィブリリンの重合体であるマイクロフィブリルのみで構成されるオキシタラン線維。少量のエラスチンと多量のマイクロフィブリルで構成されるエラウニン線維。多量のエラスチンと少量のマイクロフィブリルで構成される弾性線維。これら3つが弾性系線維である。³⁾

・ オキシタラン線維

オキシタラン線維はマイクロフィブリルの集合体であり、エラスチン沈着は見られない。オキシタラン線維は毛様体や歯根膜、神経上膜、腱、鼓膜で観察されており、多くの結合組織に存在している。オキシタラン線維は組織構造の支持や組織の弾性・膨張調節作用をしていると考えられている。

・ エラウニン線維

エラウニン線維はオキシタラン線維とは異なり、マイクロフィブリル間に少量のエラスチンが存在している。エラウニン線維はエラスチン沈着が起きているため、オキシタラン線維との区別は容易だが、弾性線維との明確な区別は存在しない。エラウニン線維は血管弾性板や弾性軟骨、腱、真皮に存在している。生体組織ではオキシタラン線維と弾性線維との間をつなぐ線維として観察される。そのため、オキシタラン線維から弾性線維へと移行するときの中間体として存在していると考えられる。

・ 弾性線維

弾性線維は動脈や靱帯、肺など特に曲げ伸ばしや内外から圧力がかかりやすい組織に存在している。弾性線維が形成されるには、まず初めにフィブリリンが細胞から分泌されマイクロフィブリルを形成する。マイクロフィブリルは分泌されたトロポエラスチンの凝集を促し、分子サイズを大きくさせる。その後、凝集したトロポエラスチンはマイクロフィブリル上に沈着し、リシルオキシダーゼが作用することによりデスモ

シン架橋が形成され、トロポエラスチンはエラスチンへと成熟する。これらの段階を経たうえで弾性線維は形成されている。⁴⁾

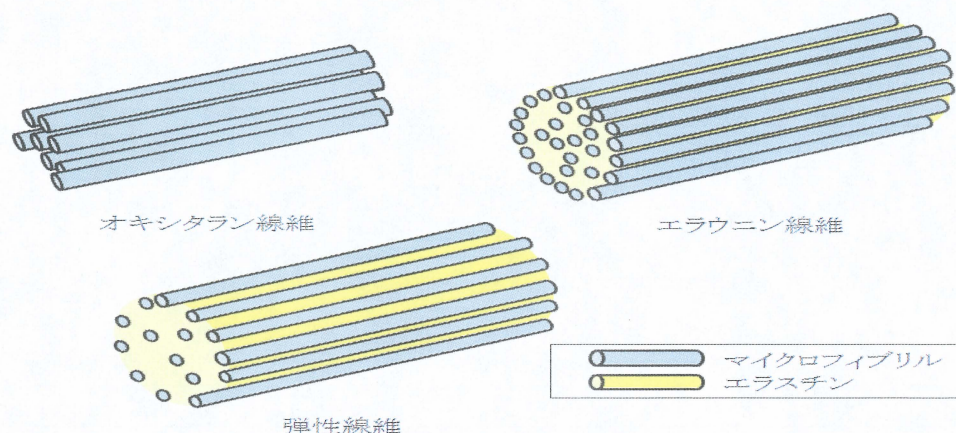


Fig.1-3 弾性系線維³⁾

1-2-3 エラスチン

細胞外マトリックスの一つであるエラスチンは、体内では弾性線維に存在しているタンパク質である。伸縮性・弾性を生み出す線維状タンパク質で、動脈で約 50%、靱帯で約 80%、肺で約 20%がエラスチンで構成されている。多くの動物内に存在しており、年齢の増加と共にエラスチンの量は減少していく。それにより、しわが生まれる原因の物質であるとも言われている。

エラスチンはその単量体である分子量が約 67kDa のトロポエラスチンがリシルオキシダーゼにより架橋されることで形成される。その架橋はリシン 4 残基で構成されるデスモシン架橋であり、エラスチン特有のものである。これにより、伸縮性や不溶性といった性質が生まれている。エラスチンは、その構造内のほとんどを疎水性アミノ酸で占めており、そのうちグリシンだけで 30%を占め、さらにプロリンやアラニンに富んでいる。それにより、エラスチンには疎水性相互作用が生まれ、コアセルベーションという加熱すると凝集、冷却すると元に戻るという機能を持っている。また、エラスチンの構造内には細胞応答領域である VGVAPG(バリン-グリシン-バリン-アラニン-プロリン-グリシン)配列と、架橋領域である KAAAK(リシン-アラニン-アラニン-アラニン-リシン)配列が存在している。(Fig.1-4)細胞応答領域では EBP (Elastin binding protein)レセプターを介して細胞とやり取りを行っている。また、架橋領域ではこの領域に存在するリシン残基でデスモシン架橋が形成されている。

エラスチンは酸やアルカリで処理することにより、可溶性にすることができる。一般的に、酸で処理した水溶性エラスチンは α -エラスチン、アルカリで処理した水溶性エラスチンは κ -エラスチンと呼ばれている。

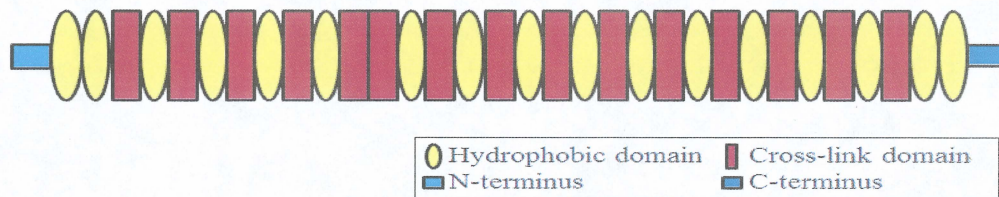


Fig.1-4 エラスチンのドメイン構造 ⁵⁾

1-2-4 フィブリリン

フィブリリンは分子量が約 350kDa のタンパク質で、細胞外マトリックスの一つである。フィブリリンは長さが約 160nm であるが、分子は折りたたまれた状態で存在している。この折りたたみ部位はビーズ状構造として観察される。また、生体内では直径 10～12nm のマイクロフィブリルという微小線維を形成している。マイクロフィブリルは管状線維構造を取っており、枝分かれしない長い線維で観察される。また、マイクロフィブリルはフィブリリン分子が 6 から 8 本で構成されることが観察されている。⁶⁾

マイクロフィブリルの機能は弾性線維形成とその構造の維持、インテグリンレセプターを介したシグナリングなどがある。弾性線維形成においてフィブリリンからなるマイクロフィブリルがトロポエラスチンの沈着を促し、弾性線維が形成される。その過程においてフィブリリンは、トロポエラスチンが架橋しエラスチンへと成熟するために必要なタンパク質となっている。そのため、フィブリリンはエラスチンが存在する多くの弾性組織に存在しているが、他にも眼の毛様体小帯などエラスチンが無い部位にもオキシタラン線維として存在している。

フィブリリンはドメイン構造をとっており、主に EGF(epidermal growth factor)様ドメイン、cb-EGF(calcium-binding epidermal growth factor)様ドメイン、TB(transforming growth factor β binding)ドメイン、EGF 様ドメインと TB ドメインが混合したハイブリッドドメインなどで構成されている。(Fig.1-5)それぞれのドメイン内にシステインを多く含んでおり、ドメイン内でジスルフィド結合を形成している。ただし、N 末端側のハイブリッドドメインにはシステインが一つ余っており、このシステインにより分子間のジスルフィド結合が形成されている。この結合を切ることでフィブリリンは水溶性にすることが可能である。⁷⁾

フィブリリンはいくつかの種類が確認されており、現在までにフィブリリン-1 から 3 ままでが確認されている。主に研究が進められているのはフィブリリン-1、2 の二つであり、フィブリリン-3 はごく最近に発見され、まだあまり研究が進んではいない。フィブリリン-1 とフィブリリン-2 は類似した構造をしているがいくつか違いがある。大きな

違いとして、ドメイン内のほぼ同じ位置で、フィブリリン-1 ではグリシン、フィブリリン-2 ではプロリンが多いドメインを持っている。また、フィブリリン-1 にはインテグリンと応答するための配列である RGD(アルギニン-グリシン-アスパラギン)配列が一つあり、フィブリリン-2 には二つある。フィブリリン-1 はその遺伝子異常により、マルファン症候群を引き起こし、フィブリリン-2 は先天性拘縮性クモ指症候群を引き起こす原因となっている。^{8), 9)}マルファン症候群は同じ欠陥遺伝子を持った遺伝病であるが、症状は一定ではない。主に結合組織が脆弱となり弾性が失われるが、大動脈や網膜、硬膜、骨の形成と症状は多岐にわたる。先天性拘縮性クモ指症候群は主に関節に影響がある。手足が長細い体型で生まれることや、肘、膝、指などの屈曲拘縮が見られる。また、外耳が変形しているといった特徴がある。関節の拘縮などは年齢と共に改善されることが多い。

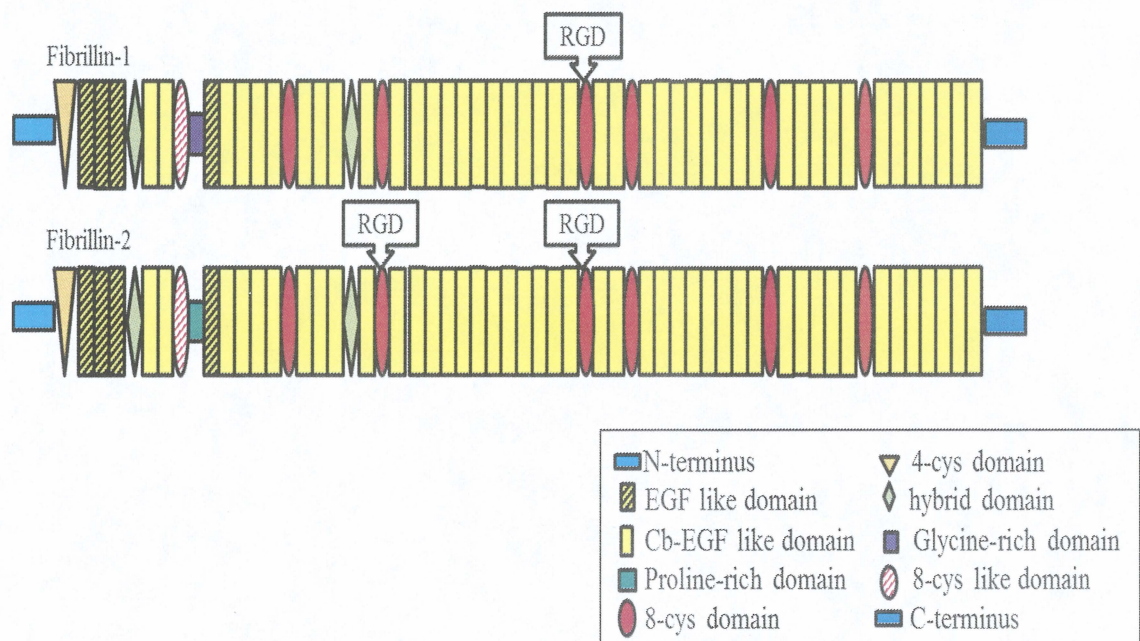


Fig.1-5 フィブリリンのドメイン構造¹⁰⁾

1-3 本研究の目的

当研究室では、以前からエラスチンの抽出を行っており、それを用いたゲルやシートを作製してきた。¹⁾それによって人工臓器など生体材料の足場材料を作製することを目指し、日々研究を行ってきた。しかし、エラスチン単体で伸びるゲルを作製すると～100kPa ほどの弾性率でしかなく、より強い力学的強度を必要とする弾性組織には使用することができないという問題があった。そこで生体内で同じ弾性組織に存在するフィブリリンに注目した。

エラスチンとフィブリリンは同じ弾性線維に存在するタンパク質である。このことから、エラスチンとフィブリリンを組み合わせることで、弾性線維を模倣した材料を開発することができれば、人工臓器の材料として用いるために必要な強度・生体適合性を持つ材料を作り出すことができると考えた。そのため、エラスチン・フィブリリン複合化材料の開発を目的とした。

そこで本研究では、まずフィブリリンの抽出と同定を行った。その後、エラスチンとフィブリリンを混合した際の反応性を検証した。その結果を考慮したうえで複合ゲルの開発を行った。その時、弾性線維形成に基づいた方法をいくつか検証し、より力学的強度が高くなる方法を模索した。

2 章 実験手順

2-1 水溶性エラスチンの抽出

【試薬・機器】

- ・ 不溶性エラスチン粉末
- ・ クエン酸 (Wako)
- ・ 水酸化ナトリウム (Wako)
- ・ 50ml 遠沈管 (BIOLOGIX)
- ・ 500ml 耐圧瓶 (APPROX)
- ・ 透析用セルロースチューブ (三光純薬株式会社)
- ・ 遠心分離機 CT 6D (HITACHI)
- ・ pH メーターD-50 (HORIBA)
- ・ 膜フィルター (0.45 μ m) (ADVANTEC)
- ・ 吸引瓶 (VINDEXTM)
- ・ アスピレーター
- ・ 凍結乾燥機 FZ-4.5 (LABCONCO)
- ・ ミキサー (TESCOM)
- ・ 茶葉粉碎機 EU6820 (National)
- ・ 網ふるい (目開き:600 μ m) (TOKYO SCREEN CO.LTD.)

【実験操作】

- ① 耐圧瓶に不溶性エラスチンと 10% クエン酸水溶液を加え、冷蔵庫で一晩保存し、不溶性エラスチンを膨潤させた。
- ② 不溶性エラスチンを耐圧瓶ごとオートクレーブ内に入れ、110℃で45min加熱し、その後15min置いた。この時、圧が下がりきらない場合には強制的に圧を抜いた。
- ③ 氷水に瓶を沈め、完全に冷え切るまで瓶を回転させながら冷却した。
- ④ 50ml 遠沈管に移し、遠心分離(3000rpm・6min)にかけた。
- ⑤ 遠沈管に残った沈殿物は耐圧瓶に戻し、同濃度のクエン酸を加え再度オートクレーブで加熱した。
- ⑥ 上澄み液を10M 水酸化ナトリウム水溶液で中和した。その後、50ml 遠沈管に移し、遠心分離(3000rpm・6min)にかけた。この時に析出する沈殿物は不溶性フィブリリンとして回収した。

- ⑦ 上澄み液を透析用セルロースチューブ(除去分子量 10000～14000)に入れ、手付きビーカーで透析を行った。
- ⑧ ②～⑦の行程をエラスチンがすべて溶けるまで繰り返した。この際、上澄み液を加熱回数で区分した。
- ⑨ 上澄み液を入れた透析チューブは脱イオン水で透析を行った。透析外液は朝昼晩の 3 回交換した。また、朝に一度透析外液の浸透圧を測定し、浸透圧の値が安定するまで透析を行った。
- ⑩ 溶液を 50ml 遠沈管に移し、遠心分離(3000rpm・6min)にかけた。
- ⑪ 上澄み液を膜フィルター・ガラスフィルターで吸引ろ過し、ろ液を耐圧瓶に入れ 2～3 日凍結乾燥することで水溶性エラスチンの粉末を得た。
- ⑫ 得た粉末に対し、弾性率測定と凝集温度測定を行い、クエン酸処理回数ごとにクラス分けを行った。

2-2 水溶性フィブリリンの抽出

【試薬・機器】

- ・ Tris(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール) (Wako)
- ・ 塩酸 (Wako)
- ・ 尿素 (Wako)
- ・ EDTA
- ・ 2-メルカプトエタノール (Wako)
- ・ 500ml 耐圧瓶 (APPROX)
- ・ 50ml 遠沈管 (VIOLAMO)
- ・ ステリカップ フィルターユニット (0.45 μ m) (MILLIPORE)
- ・ スターラー
- ・ 攪拌子
- ・ アスピレーター
- ・ 透析用セルロースチューブ (三光純薬株式会社)
- ・ 遠心分離機 (HITACHI)
- ・ pH メーターD-50 (HORIBA)
- ・ 凍結乾燥機 FZ-4.5 (LABCONCO)

【実験操作】

- ① 0.1M pH8.5 の Tris-HCl を調整し、これをバッファーとして Tris-HCl(6M 尿素、0.05M 2-メルカプトエタノール、0.1% EDTA)を調整した。
- ② 不溶性フィブリリンを原料とし、Tris バッファーとともに耐圧瓶に加えた。その後、

- アスピレーターを用いて 20min 脱気し、N₂を充填した。37℃で 24h 攪拌した。
- ③ 攪拌後、50ml 遠沈管に移し、遠心分離(4500rpm、20min)した。
 - ④ 上澄み液を透析用セルロースチューブに入れ、脱イオン水で透析を約 1 週間行った。
 - ⑤ 透析後、遠心分離(10000rpm、20min)を行った。
 - ⑥ 上澄み液はステリカップ フィルターユニットを用いてろ過を行った。その後、凍結乾燥を行い、水溶性フィブリリンの粉末を得た。

2-3 フィブリリンの同定

2-3-1 SDS-PAGE (銀染色)

【試薬・機器】

- ・ 水溶性フィブリリン
- ・ Tris(2-アミノ-2-ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール) (Wako)
- ・ 塩酸 (Wako)
- ・ SDS(ドデシル硫酸ナトリウム) (Wako)
- ・ 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 (Wako)
- ・ BPB(ブロモフェノールブルー)
- ・ 2-メルカプトエタノール (Wako)
- ・ グリセロール
- ・ TEMED(N,N,N,N-テトラメチレンジアミン)
- ・ 分子量マーカー (BIO RAD)
- ・ 前面ガラス板
- ・ ミミ付きガラス板
- ・ シリコンガasket
- ・ コーム
- ・ クリップ
- ・ 電気泳動層 AE-6410 型 (ATTO)
- ・ 電源装置 クロスパワー500 (ATTO)
- ・ アスピレーター

【試薬調製】

- ・ 1.5M Tris-HCl(pH8.8),0.4%SDS

Tris54.5g、SDS1.2g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 にメスアップした。

- ・ 0.5M Tris-HCl(pH6.8),0.4%SDS

Tris6.0g,SDS0.4gを脱イオン水に溶かし、5N HCl(約 9ml)を加えて pH6.8 に合わせて脱イオン水で 100ml にメスアップした。

- ・ 30%アクリルアミド溶液

アクリルアミド 58g,Bis2.0g を脱イオン水に溶かし、200ml に脱イオン水でメスアップした。

- ・ 0.4%SDS

SDS0.2g に脱イオン水 50ml を加えて溶解した。

- ・ 10%APS

APS0.1g に脱イオン水 1ml を加えて溶解した。

- ・ 泳動バッファー

Tris3.0g、グリシン 14.4g を脱イオン水で溶かし、1000ml にメスアップした後に、SDS1.0gを加えて溶解させた。

- ・ 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 数滴混ぜた。

- ・ 5% Running gel 溶液

30%アクリルアミド溶液 2.0ml、1.5M Tris-HCl (pH8.8) ,0.4%SDS3.0ml、10%APS120 μ l、TEMED12 μ l、脱イオン水 7.0ml を混ぜた。

- ・ Stacking gel 溶液

30%アクリルアミド溶液 0.9ml、0.5M Tris-HCl (pH6.8),0.4%SDS1.5ml、10%APS60 μ l、TEMED6 μ l、脱イオン水 3.6ml を混ぜた。

【実験操作】

- ① 前面ガラス板、ミミ付きガラス板、シリコンガasket、コームをエタノールで拭いた。
- ② ミミ付きガラス板上にシリコンガasketを設置し、前面ガラス板をのせて、クリップでとめた。
- ③ コームを差し込み、コームの下端から 5 mmの位置に目印を入れた。
- ④ Running gel、Stacking gel 溶液を TEMED 無しで作成し、Running gel 溶液をアスピレーターで脱気した。

- ⑤ TEMED を加え、Running gel 溶液をゲル板の目印あたりまで入れ、脱イオン水をゲル液面に加え、ゲル化するまで静置した(約 1h)。
- ⑥ Stacking gel 溶液をアスピレーターで脱気し、その後、TEMED を加え、ゲル板に Stacking gel 溶液を入れ、コームを差し込みゲル化させた。
- ⑦ それぞれの溶液を 0.1% に調製し、それぞれを 15 μ l 取り、サンプルバッファーと 1:1 で混合し、ボルテックスで攪拌した。
- ⑧ 電気泳動層に泳動バッファーを入れた。
- ⑨ ゲル化後、コームを抜き取り、クリップ等を外し、ゲル板を締め付け具に固定し、電気泳動層に入れた。
- ⑩ ゲルの上部が十分に浸るぐらい電界層液を入れた。
- ⑪ シリンジでウェルを洗浄し、サンプルをピペットでウェルに入れた。
- ⑫ 電源を入れ、15mA (2 枚行う場合は 30mA) の定電流で泳動した。

2-4-2 銀染色

【試薬・機器】

- ・ メタノール (Wako)
- ・ 酢酸 (Wako)
- ・ EzStain Silver AE-1360 (ATTO)
 - ・ S-1 液 (チオ硫酸ナトリウム)
 - ・ S-2 液 (硝酸銀)
 - ・ S-3 液 (水酸化ナトリウム)
 - ・ S-4 液 (ホルムアルデヒド、チオ硫酸ナトリウム)
- ・ 染色用トレイ
- ・ 振とう器

【試薬調製】

- ・ ①液 (固定液)
脱イオン水 40ml、メタノール 50ml、酢酸 10ml、S-1 液 1ml を混ぜた。
- ・ ②液 (染色液)
脱イオン水 100ml、S-2 液 1ml を混ぜた。
- ・ ③液 (発色液)
脱イオン水 200ml、S-3 液 1ml、S-4 液 1ml を混ぜた。
- ・ ④液 (停止液)
脱イオン水 100ml、酢酸 1ml を混ぜた。

【実験操作】

- ① 染色用トレイに①液を入れておき、電気泳動終了後、ゲルを入れ 10min 振とうし、廃液した。
- ② 脱イオン水 100ml を加え 10min 振とう、その後廃液を 3 回繰り返した。
- ③ ②液を加え、5min 振とうし、廃液した。
- ④ 脱イオン水 100ml を加え、正確に 30sec 振とうし、廃液した。
- ⑤ ③液 100ml を加え、正確に 30sec 振とうし、廃液した。
- ⑥ ③液の残り100mlを加え、適度な銀染色像となる少し前(5～10min)まで振とうし、廃液した。
- ⑦ ④液を加え、10min 振とうし、廃液した。
- ⑧ 脱イオン水 100ml を加え、5min 振とうし、廃液した。これをもう一度繰り返した。

2-3-3 アミノ酸分析

【試薬・機器】

- ・ 不溶性エラスチン
- ・ 不溶性フィブリリン
- ・ 水溶性フィブリリン
- ・ 6N 塩酸 シーケンス解析用 (和光純薬)
- ・ 硫酸 (Wako)
- ・ ネジロ試験管 (マルエム)
- ・ 真空ポンプ
- ・ ミニオーブン (テラオカ)

【実験操作】

- ① 試験管を濃硫酸に浸して洗浄し、その後 80℃で乾燥させた。乾燥後はすぐに蓋をして保存した。
- ② 試料を約 2mg 精秤し、試験管に入れた。その後、6N 塩酸を 1ml 加えた。
- ③ 液体窒素を用いて試料を凍結した。真空ポンプにつなぎ、塩酸を溶かして溶存空気を取り除いた。この時に、泡立ちすぎると試料が失われるため、激しくなりすぎるときはもう一度凍結させて再度溶かした。
- ④ ミニオーブンに試験管ごと入れ、110±1℃で 24h 加熱した。
- ⑤ 十分冷ました後に取り出し、三重県工業研究所に分析を委託した。

2-4 エラスチンとフィブリリンの相互作用

2-4-1 混合溶液の透過光強度測定

【試薬・機器】

- ・ 水溶性エラスチン
- ・ 水溶性フィブリリン
- ・ フォトメーター(Industrial Fiber Optics)
- ・ ヘリウムネオンガスレーザー(Uniphase)
- ・ 恒温槽(和科盛商会)
- ・ 透過光測定装置
- ・ ディスポセル

【実験操作】

- ① 水溶性エラスチン溶液と水溶性フィブリリン溶液を 1%になるように調製した。
- ② ディスポセルにエラスチン溶液とフィブリリン溶液を合計 3ml になるように混合した。この際、エラスチン対フィブリリンの混合比率を細かく変えて作製した。
- ③ ディスポセルを透過光測定装置にセットし、恒温槽で 10℃に保ち、この時の透過光強度を測定した。

2-5 エラスチン・フィブリリン複合化ゲルの作製

2-5-1 フィブリリンゲルの作製

【試薬・機器】

- ・ 水溶性エラスチン
- ・ 水溶性フィブリリン
- ・ Dode-DSP
- ・ EGDE (Ethylene glycol diglycidyl ether)
- ・ 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) (三商)
- ・ 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)
- ・ 循環恒温水槽 (LAUDA)
- ・ オートクレーブ IST-150 (Pasolina)

- ・ インキュベータ IC-450PC (AS ONE)

【実験手順】

- ① フィブリリン濃度 20%、アミノ基に対する架橋剤が 2 倍になるように Dode-DSP(もしくは EGDE)を加えた。その後、遠心分離(2000rpm・3min)を行い、脱気した。
- ② 脱気した混合溶液を 2.5cm の長さに切ったキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて、遠心分離(1500rpm・3min)を行った。
- ③ 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℃にした循環恒温槽で 30min 加熱した。
- ④ 再度、遠心分離(1500rpm・3min)を行い、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 30min 加熱した。
- ⑤ 加熱後、試験管からキャピラリーを取り出し、シリンジの針を用いてキャピラリーからゲルを取り出した。その後、ゲルを再度試験管に入れて脱イオン水で満たし、37℃で 18h 洗浄した。

2-5-2 I 型複合ゲル作製

【実験手順】

- 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 Dode-DSP を加え、フィブリリン濃度 2.1%、脱イオン水を混合した。その後、遠心分離(2000rpm・3min)を行い、脱気した。
- ② 脱気した混合溶液を 2.5cm の長さに切ったキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて、遠心分離(1500rpm・3min)を行った。
- ③ 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℃にした循環恒温槽で 30min 加熱した。
- ④ 再度、遠心分離(1500rpm・3min)を行い、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 30min 加熱した。
- ⑤ 加熱後、試験管からキャピラリーを取り出し、シリンジの針を用いてキャピラリーから複合ゲルを取り出した。その後、複合ゲルを再度試験管に入れて脱イオン水で満たし、37℃で 18h 洗浄した。

2-5-3 II型複合ゲル作製

【実験手順】

- ① エラスチン濃度 20%、脱イオン水、アミノ基に対する架橋剤倍率が 2 倍になるように Dode-DSP を加えて混合した。エラスチン溶液を 50℃にした循環恒温槽に入れ 30min 加熱し、凝集させた。
- ② 加熱後、凝集させたままの状態ではフィブリリン濃度 1.1%になるように混合した。その後、遠心分離(2000rpm・3min)を行い、脱気した。
- ③ 脱気した混合溶液を 2.5cm の長さに切ったキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて、遠心分離(1500rpm・3min)を行った。
- ④ 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℃にした循環恒温槽で 30min 加熱した。
- ⑤ 再度、遠心分離(1500rpm・3min)を行い、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 30min 加熱した。
- ⑥ 加熱後、試験管からキャピラリーを取り出し、シリンジの針を用いてキャピラリーから複合ゲルを取り出した。その後、複合ゲルを再度試験管に入れて脱イオン水で満たし、37℃で 18h 洗浄した。

2-5-4 III型複合ゲル作製

【実験手順】

- ① エラスチン濃度 30%、脱イオン水、アミノ基に対する架橋剤倍率が 0.5 倍になるように Dode-DSP、1.5 倍になるように EGDE を加えて混合した。
- ② フィブリリン濃度 20%、脱イオン水、アミノ基に対する架橋剤倍率が 2 倍になるように EGDE を加えて混合した。
- ③ エラスチンが 30%含まれていることを基本として混合比率に合うようにフィブリリン溶液を混合した。(Table.2-1)その後、遠心分離(2000rpm・3min)を行い、脱気した。
- ④ 脱気した混合溶液を 2.5cm の長さに切ったキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて、遠心分離(1500rpm・3min)を行った。
- ⑤ 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℃にした循環恒温槽で 30min 加熱した。
- ⑥ 再度、遠心分離(1500rpm・3min)を行い、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 30min 加熱した。
- ⑦ 加熱後、試験管からキャピラリーを取り出し、シリンジの針を用いてキャピラリーから複合ゲルを取り出した。その後、複合ゲルを再度試験管に入れて脱イオン水で満たし、37℃で 18h 洗浄した。

Table.2-1 III型複合ゲル仕込み表

エラスチン 比率(%)	エラスチン (mg)	フィブリリン (mg)	Dode-DSP ^{※1} (μ L)	EGDE ^{※2} (μ L)	Water (μ L)
100	36	0	1.21	2.75	82.79
90	36	4	1.21	7.84	70.95
85	36	6.4	1.21	10.90	65.49
80	36	9	1.21	14.21	59.58
75	36	12	1.21	18.03	52.76
70	36	15.4	1.21	22.36	45.03
65	36	19.4	1.21	27.45	35.94

※1:Dode-DSP 濃度(1000mM)

※2:EGDE 濃度(1320mM)

2-5-5 IV型複合ゲル作製

【実験手順】

- ① エラスチン濃度 30%、脱イオン水、アミノ基に対する架橋剤倍率が 2 倍になるように Dode-DSP を加えて混合した。
- ② フィブリリン濃度 20%、脱イオン水、アミノ基に対する架橋剤倍率が 2 倍になるように Dode-DSP を加えて混合した。
- ③ エラスチンが 30%含まれていることを基本として混合比率に合うようにフィブリリン溶液を混合した。(Table.2-2)その後、遠心分離(2000rpm・3min)を行い、脱気した。
- ④ 脱気した混合溶液を 2.5cm の長さに切ったキャピラリーに詰め、栓をした後にネジロ試験管に入れて、遠心分離(1500rpm・3min)を行った。
- ⑤ 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℃にした循環恒温槽で 30min 加熱した。
- ⑥ 再度、遠心分離(1500rpm・3min)を行い、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 30min 加熱した。
- ⑦ 加熱後、試験管からキャピラリーを取り出し、シリンジの針を用いてキャピラリーから複合ゲルを取り出した。その後、複合ゲルを再度試験管に入れて脱イオン水で満たし、37℃で 18h 洗浄した。

Table.2-2 IV型複合ゲル仕込み表

エラスチン比率(%)	エラスチン(mg)	フィブリリン(mg)	Dode-DSP(μ L) ※	Water (μ L)
100	36	0	4.84	79.16
90	36	4	11.24	68.76
85	36	6.4	15.52	62.08
80	36	9	19.97	55.03
75	36	12	25.01	46.9
70	36	15.4	30.78	37.82
65	36	19.4	37.43	63.17

※Dode-DSP 濃度(1000mM)

Table.2-3 複合ゲル比較

複合ゲル	I 型	II 型	III 型	IV 型
エラスチン濃度(%)	40	20	30	30
混合前加熱	無	有	無	無
フィブリリン濃度(%)	2.1	1	1.5～10.5	1.5～10.5
架橋剤	Dode-DSP	Dode-DSP	Dode-DSP EGDE	Dode-DSP

2-6 複合ゲルの弾性率・伸長率測定

【試薬・機器】

- ・ 複合ゲル
- ・ 弾性率測定装置
- ・ アナログ計測計算機(アズワン)

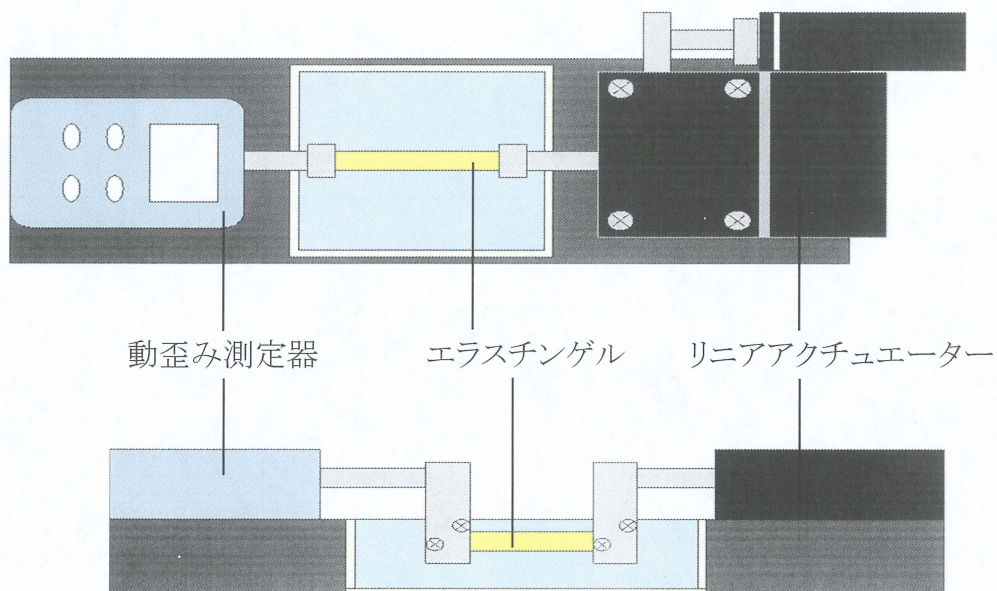


Fig.2-1 弾性率測定器

【実験操作】

- ① 1.5cm 程度に切ったエラスチンゲルの両端にスペーサーを付け、弾性率測定器で挟み、固定した。
- ② 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し、その時のスペーサー間のゲルの長さを自然長とした。
- ③ 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た。
- ④ 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、弾性率を求めた。また、自然長と破断時のゲル長から伸びを求め、そこから伸張率以下の式より求めた。

$$\text{破断時の伸び (m)} / \text{自然長 (m)} \times 100 = \text{伸張率 (\%)}$$

2-7 複合ゲル構造の観察

【試薬・機器】

- ・ 複合ゲル
- ・ 35 φ 浮遊培養シャーレ
- ・ 凍結乾燥機 FZ-4.5 (LABCONCO)
- ・ 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)

【実験操作】

- ① 作製した複合ゲルを 35 φ 浮遊培養シャーレに入れ、凍結させた。
- ② 複合ゲルを凍結乾燥させた。
- ③ 複合ゲ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。
- ④ SEM で撮影された画像の解析を行った。



イオンスパッター



走査型電子顕微鏡 (SEM)

Fig.2-2 SEM 関連装置

3 章 結果

3-1 水溶性フィブリリンの抽出

不溶性フィブリリンを原料として水溶性フィブリリンを抽出した。フィブリリン内のジスルフィド結合を 2-メルカプトエタノールを用いて還元し、水溶性フィブリリンを得た。(Fig.3-1)

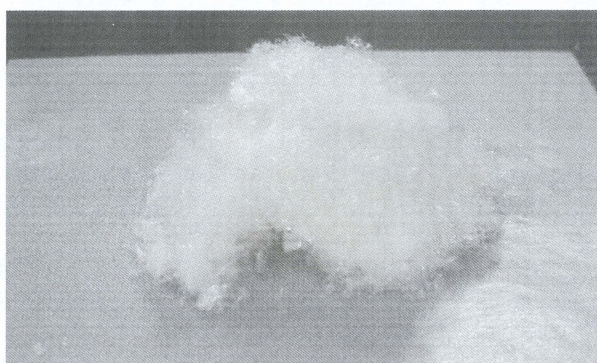


Fig.3-1 水溶性フィブリリン粉末

この結果から、不溶性フィブリリンから抽出できる水溶性フィブリリンの量は約 20%であることが示された。(Table.3-1)

Table.3-1 水溶性フィブリリンの収率

サンプル番号	開始質量(g)	獲得質量(g)	収率(%)
1	9.18	2.09	22.72
2	10.00	2.43	24.27

3-2 フィブリンの同定

3-2-1 SDS-PAGE (銀染色)

3-1 で抽出した水溶性フィブリンに対して SDS-PAGE を行い、フィブリンの分子量である 350kDa 付近にバンドが検出されるかどうかを銀染色で確認した。染色結果を Fig.3-2 で示した。

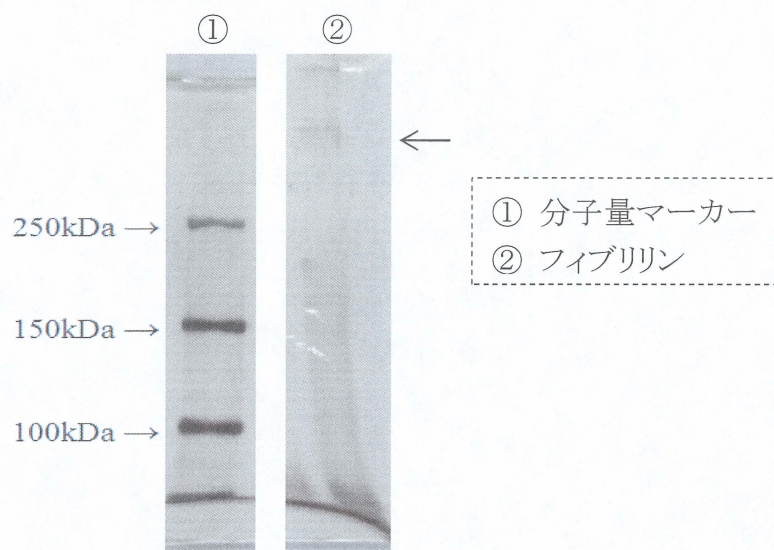


Fig.3-2 SDS-PAGE ゲル

染色結果から、250kDa 以上の位置にバンドが検出された。分子量マーカーから計算した結果、約 330kDa の分子量であることがわかった。

3-2-2 アミノ酸分析

3-1 で抽出した水溶性フィブリリンに対してアミノ酸分析を行い、フィブリリンの理論値¹⁰⁾と比較を行った。また、水溶性エラスチン・フィブリリンの原料となる不溶性エラスチンに対してもアミノ酸分析を行い、作製したフィブリリンがエラスチンとは異なる物質であるかどうか比較を行った。結果を Fig.3-3、Table.3-2 で示した。

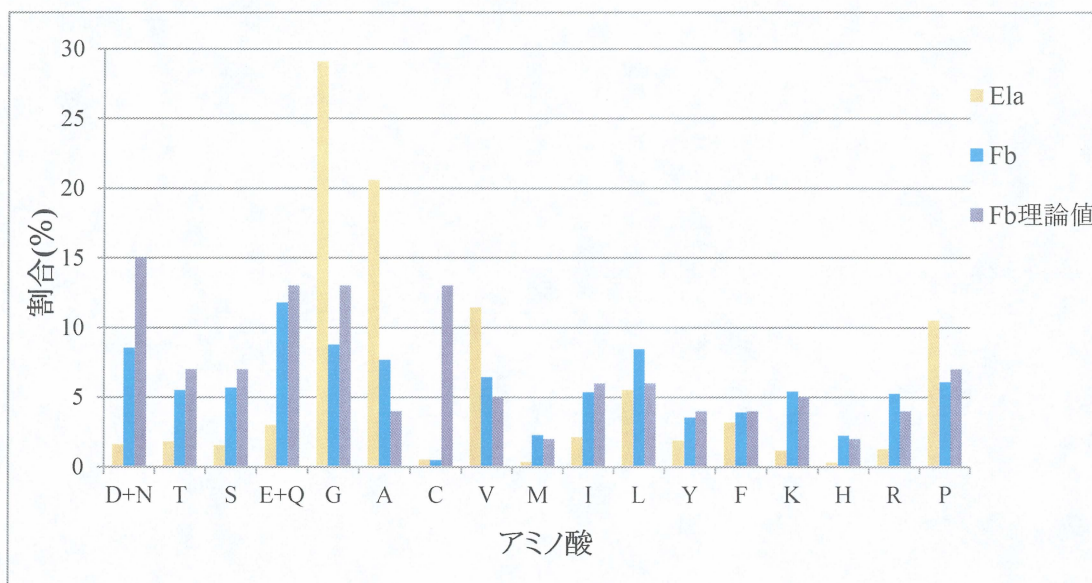


Fig.3-3 アミノ酸分析

Table.3-2 アミノ酸分析値

アミノ酸	アスパラギン + アスパラギン酸	トレオニン	セリン	グルタミン + グルタミン酸	グリシン	アラニン	システイン	バリン	メチオニン
フィブリリン(%)	8.52	5.48	5.68	11.77	8.76	7.68	0.47	6.43	2.27
エラスチン(%)	1.61	1.8	1.56	3	29.1	20.58	0.52	11.43	0.34
Fb 理論値(%)	15	7	7	13	13	4	13	5	2

アミノ酸	イソロイシン	ロイシン	チロシン	フェニルアラニン	リシン	ヒスチジン	アルギニン	プロリン
フィブリリン(%)	5.34	8.43	3.54	3.91	5.4	2.22	5.24	6.06
エラスチン(%)	2.13	5.51	1.88	3.18	1.16	0.31	1.27	10.5
Fb 理論値(%)	6	6	4	4	5	2	4	7

この結果から抽出した水溶性フィブリリンがエラスチンとはまったく異なる物質である事がわかった。また、水溶性フィブリリンとフィブリリン理論値を比較した時に、シス

テインやアスパラギンなど異なるアミノ酸は存在するが、その他のアミノ酸は近い値を取っていることがわかった。

SDS-PAGE、アミノ酸分析の結果から抽出したタンパク質がフィブリンであることが示唆された。

3-3 エラスチンとフィブリンの相互作用

精製した水溶性エラスチンと水溶性フィブリンを混合した時に白濁することを発見した。これはエラスチンとフィブリンの相互作用による現象であると推測した。そこで、エラスチンとフィブリンの混合比率の違いによる透過光強度測定から、相互作用の挙動を調べた。

エラスチン溶液とフィブリン溶液の各 1、2、3% を作製し、エラスチン比率を変化させて透過光強度変化を測定した。

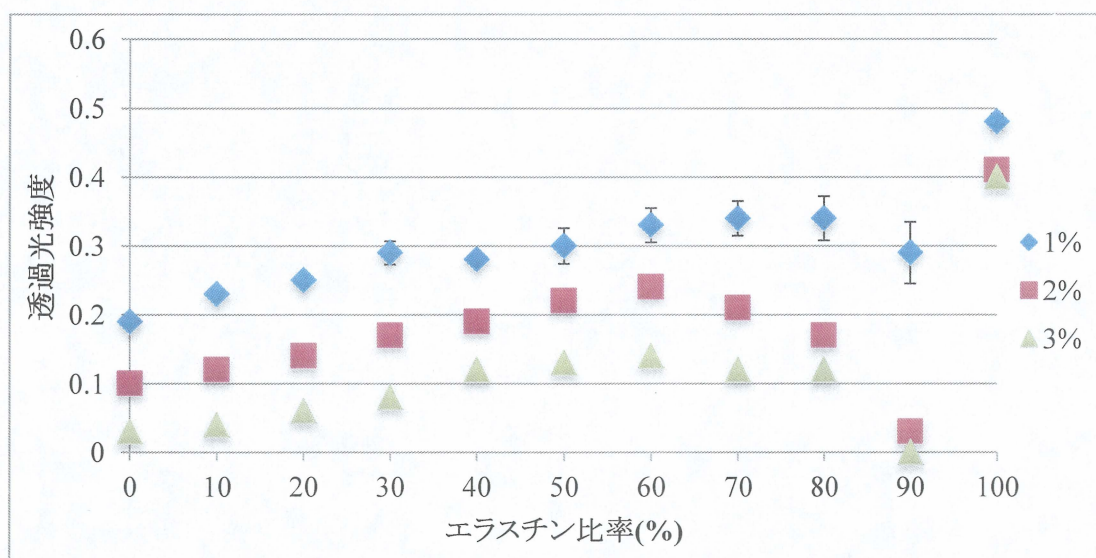


Fig.3-4 混合溶液の透過光強度変化①

Fig.3-4 の結果からどの濃度でもエラスチン比率 90% 付近で透過光強度が低い値を取ることがわかった。そのため、さらに細かい濃度比率で透過光強度変化を測定した。

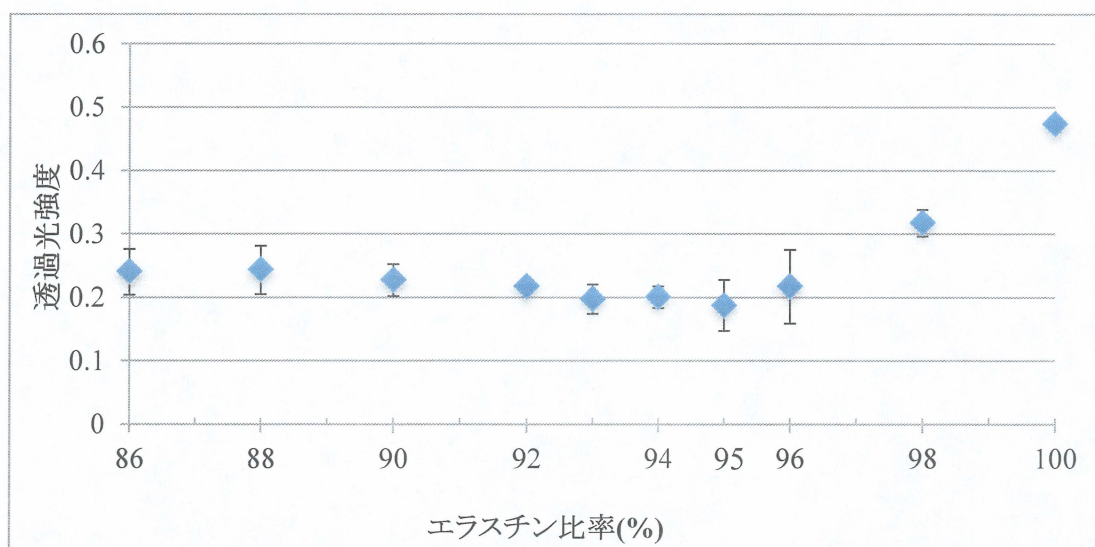


Fig.3-5 混合溶液の透過光強度変化②

Fig.3-5 の結果からエラスチン比率 95%付近で一番低い透過光強度を取ることがわかった。そのため、エラスチン対フィブリリンを 95:5 の濃度比率で混合し、複合ゲルの作製を行った。

3-4 フィブリリンゲル作製

架橋剤として Dode-DSP、EGDE 両方を用いてフィブリリンゲルを作製した。結果としてどちらの架橋剤を用いてもゲルを作製できた。しかし、どちらのフィブリリンゲルも固いが、もろいゲルになっており、引張試験器に取り付けることができなかった。そのため、弾性率・伸長率測定を行うことができなかった。

また、二つのゲルの違いとしては Dode-DSP を用いたフィブリリンゲルの方が固く、しなることもないゲルを形成しており、EGDE を用いたフィブリリンゲルはしなることができるほどの柔軟性を持っているという違いがあった。

3-5 複合ゲルの弾性率・伸長率測定

3-5-1 I 型複合ゲル

エラスチン濃度を 40%とし、それに加えてエラスチン対フィブリリンが 95:5 の比率になるようにフィブリリンを加えたゲルを作製し、エラスチンのみで作製したゲルと弾性率・伸長率の比較を行った。

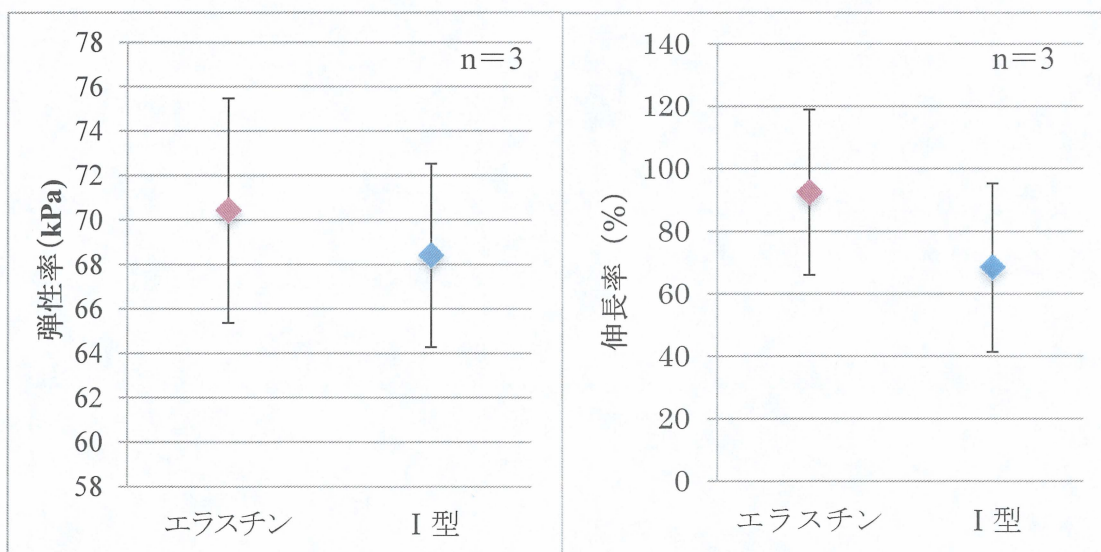


Fig.3-6 複合ゲルの弾性率・伸長率①

Fig.3-6 の結果から、弾性率ではエラスチンゲルは $70.4 \pm 5.1 \text{ kPa}$ 、I 型複合ゲルは $68.4 \pm 4.1 \text{ kPa}$ 。伸長率ではエラスチンゲルは $92.4 \pm 26.4\%$ 、I 型複合ゲルは $68.3 \pm 27.0\%$ となった。この結果から二つの間に大きな違いはないことが示された。

3-5-2 II型複合ゲル

3-5-1 で作製した I 型複合ゲルは一度目の加熱の際に凝集が見られなかった。弾性線維形成においてエラスチン分子は凝集してからマイクロフィブリルに沈着することが報告されている⁴⁾。そのため、エラスチン溶液を凝集する 20% 溶液に変更した。また、エラスチン溶液を一度 50℃ で加熱した後に、フィブリリン溶液を加えてから同様の方法で複合ゲルを作製し、エラスチンゲル、加熱していないゲルと弾性率・伸長率の比較を行った。

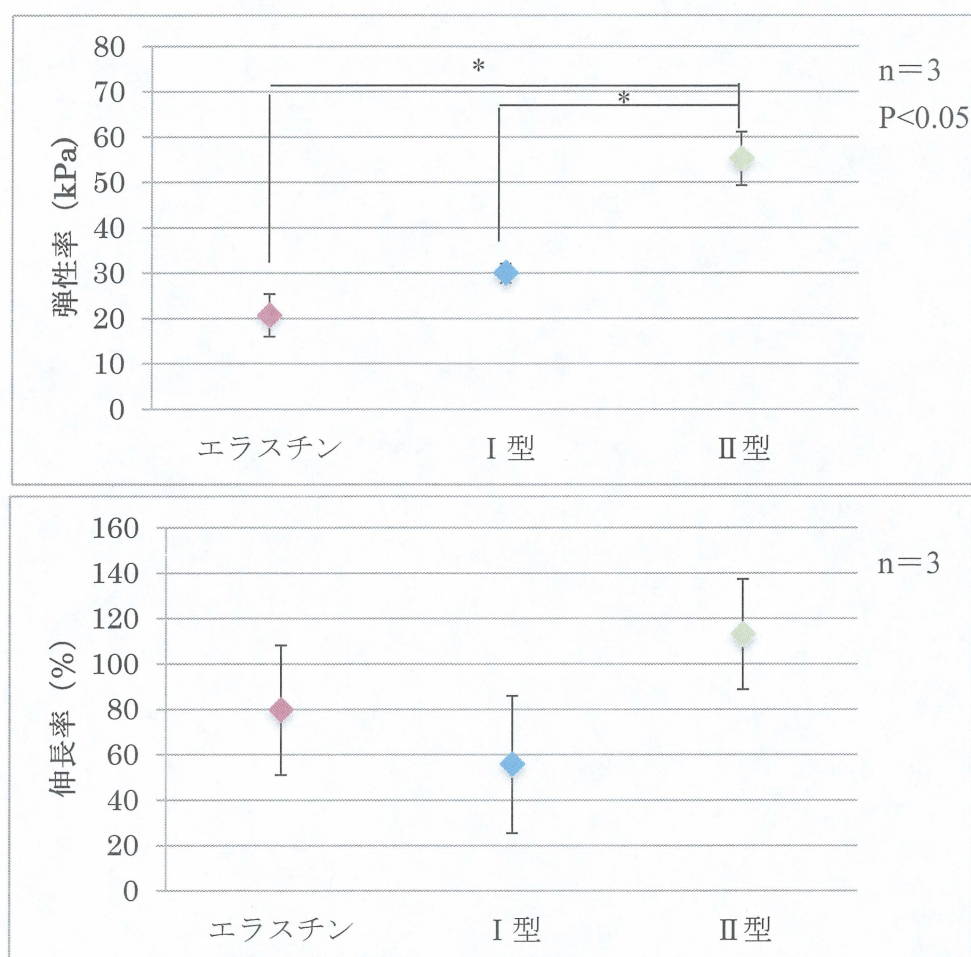


Fig.3-7 複合ゲルの弾性率・伸長率②

Fig.3-7 の結果から、弾性率ではエラスチンゲルは $20.65 \pm 4.72 \text{ kPa}$ 、I 型複合ゲルは $30.0 \pm 2.1 \text{ kPa}$ 、II 型複合ゲルは $55.2 \pm 5.9 \text{ kPa}$ となった。伸長率ではエラスチンゲルは $79.6 \pm 28.6\%$ 、I 型複合ゲルは $55.7 \pm 30.3\%$ 、II 型複合ゲルは $112.9 \pm 24.3\%$ となった。これらの結果から、エラスチンゲルよりも II 型複合ゲルは弾性率・伸長率ともに増加した。

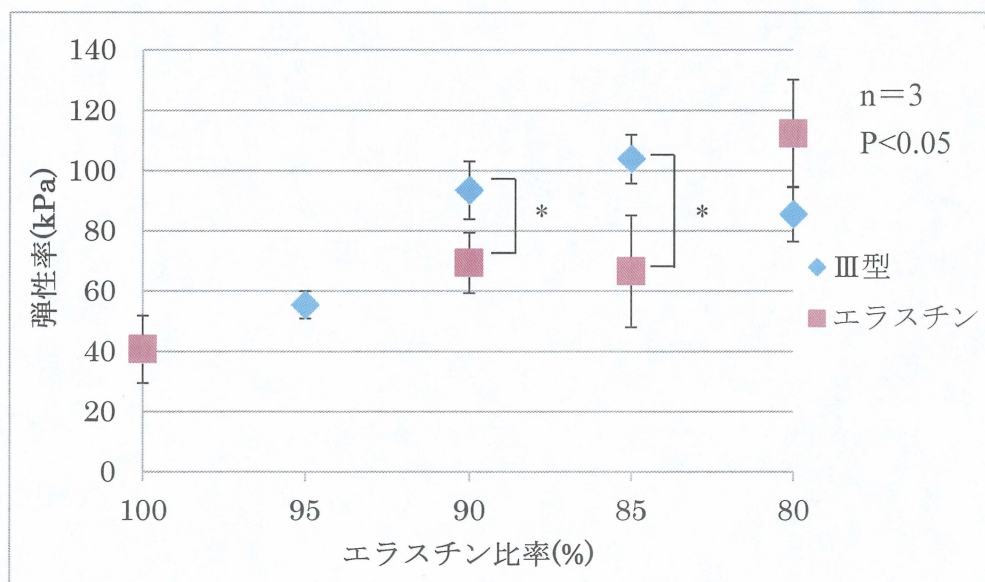
3-5-3 III型複合ゲル

弾性線維形成においては、前述したとおりトロポエラスチンがマイクロフィブリルに沈着することにより、弾性線維が成熟する。そのため、エラスチンだけでなく、フィブリリン溶液にも架橋剤を添加し、フィブリリンも架橋させることにより弾性線維形成に近い状態を作り出すことを目指した。

エラスチンがゲル中に30%含まれることを基本とし、そこに架橋倍率2倍で架橋剤(EGDE)を添加したフィブリリン溶液を加えた。その際に、混合比率を変化させて複合ゲルを作製し、弾性率・伸長率を測定した。今実験においてエラスチン・フィブリリンのアミノ基に対して架橋倍率を2倍にして実験を行っている。そのため、エラスチン比率が減少し、フィブリリン比率が増加するにつれて架橋剤の量は増えていく。(Table.3-3)

Table.3-3 III型・IV型複合ゲルの架橋倍率

エラスチン比率(%)	100	90	85	80	75	70	65
架橋倍率(倍)	2.0	4.6	6.4	8.3	10.3	12.7	15.5



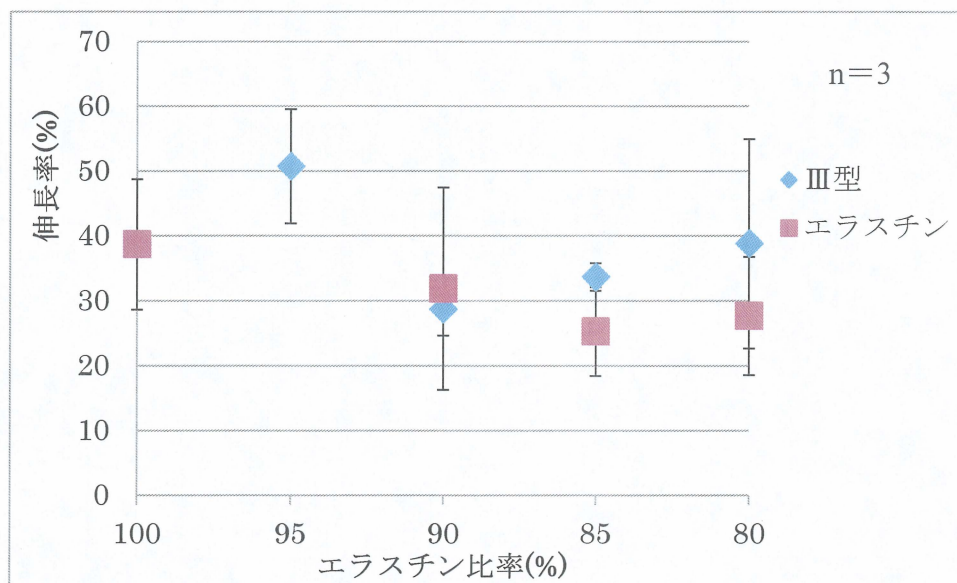


Fig.3-8 複合ゲルの弾性率・伸長率③

Fig.3-8 の結果から、エラスチン比率 85%の時に、弾性率ではエラスチンが $66.5 \pm 18.6 \text{ kPa}$ 、Ⅲ型複合ゲルが $103.9 \pm 8.1 \text{ kPa}$ 。伸長率ではエラスチンゲルが $25.2 \pm 6.8\%$ 、Ⅲ型複合ゲルが $33.7 \pm 2.1\%$ となった。また、90%の時に、エラスチンが $69.4 \pm 10.1 \text{ kPa}$ 、Ⅲ型複合ゲルが $93.5 \pm 9.6 \text{ kPa}$ 。伸長率ではエラスチンゲルが $31.9 \pm 15.6\%$ 、Ⅲ型複合ゲルが $28.7 \pm 4.1\%$ となった。これらの結果から、エラスチン比率が 90%付近でⅢ型複合ゲルの弾性率とエラスチンを比較した時に有意な差が存在した。しかし、伸長率に有意な差は存在しなかった。

3-5-4 IV型複合ゲル作製

3-5-3 で作製した複合ゲルではエラスチンと比べて弾性率が高いゲルはできたが、伸長率が低いゲルができた。その改善のために、エラスチンで用いた時に高い伸長率を持つゲルを作ることができる Dode-DSP に架橋剤を変更して複合ゲルを作製し、弾性率・伸長率を測定した。

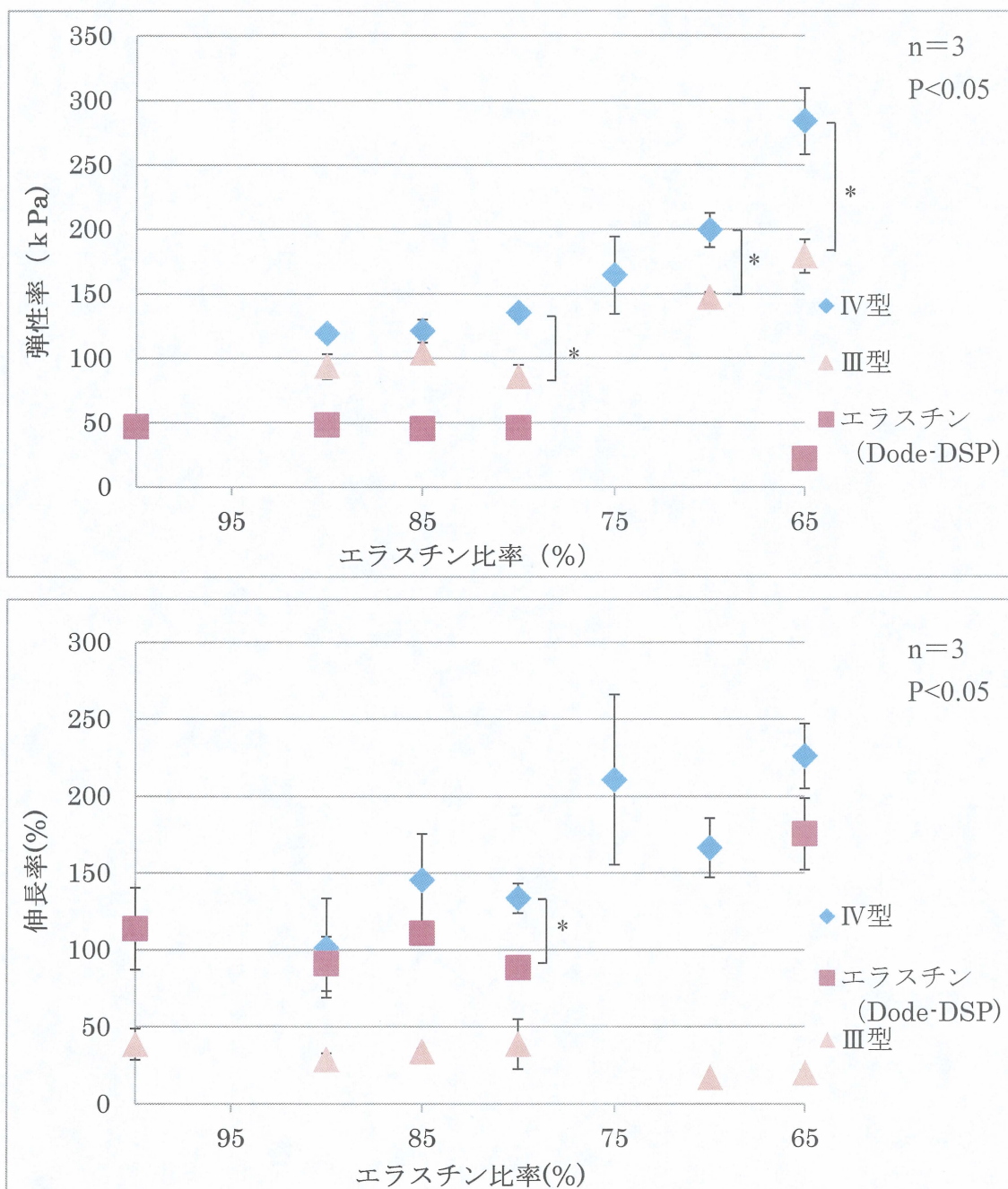


Fig.3-9 複合ゲルの弾性率・伸長率④

Fig.3-9 の結果から、IV型複合ゲルはフィブリリン比率が上昇するにつれて弾性率が增加することがわかった。また、伸長率についてもフィブリリン比率が上昇するにつれて増加する傾向がある事がわかった。結果として、IV型複合ゲルの弾性率の最大値は $284.0 \pm 25.7 \text{ kPa}$ 、伸長率の最大値は $226.1 \pm 21.1\%$ を取ることができた。これはⅢ型複合ゲルや Dode-DSP を用いたエラスチンゲルと比べてとても高い値だった。

また、エラスチンゲルでは架橋倍率が増加しても弾性率に大きい違いはみられず、過剰の場合では弾性率が減少した。伸長率に関しても架橋倍率の変化で大きい違いはみられないが、過剰の場合には逆に増加した。

3-6 IV型複合ゲル構造の観察

3-5-4 で作製したIV型複合ゲルの強度はエラスチンゲルに比べて大きな差が得られた。そこで構造的な違いの観察を行うために複合ゲルの断面を SEM で観察した。観察したゲルのうち、IV型複合ゲルは記した通りのエラスチン比率で作製したゲルを観察した。しかし、エラスチンゲルのみエラスチン比率 80%と同量の架橋剤を加えたものを作製し、観察を行った。

・ エラスチンゲル

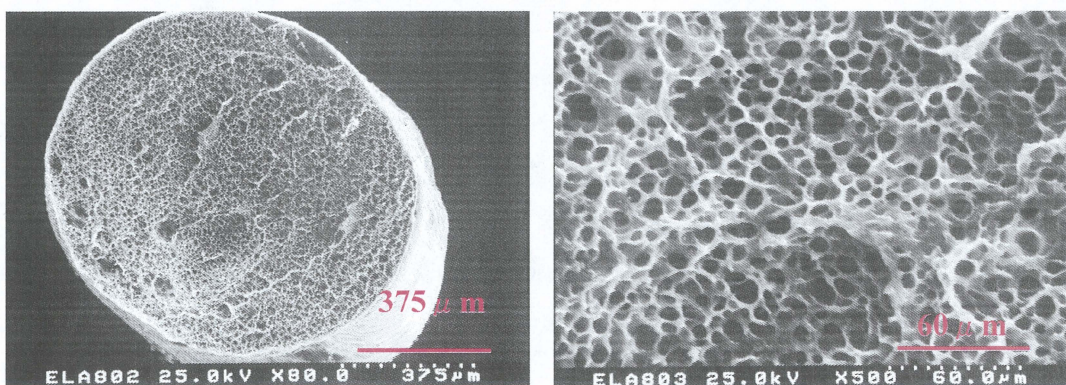


Fig.3-10 複合ゲルの断面構造(エラスチン比率 100% 左:80 倍 右:500 倍)

- ・ 複合ゲル(90%)

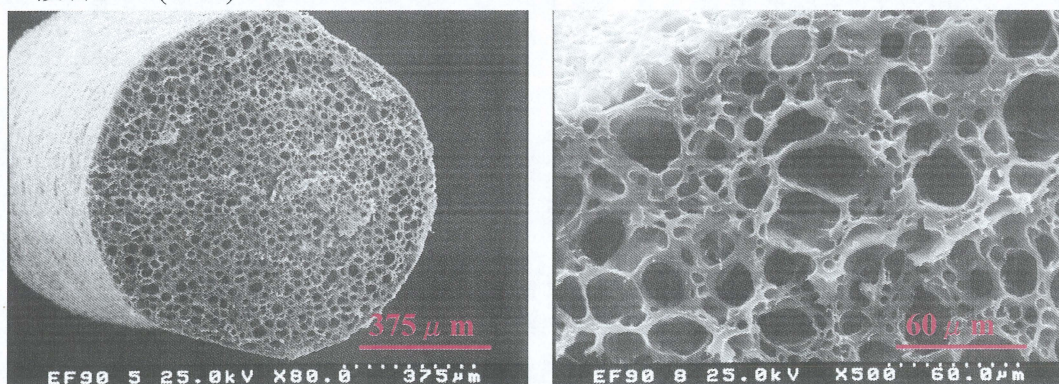


Fig.3-11 複合ゲルの断面構造(エラスチン比率 90% 左:80倍 右:500倍)

- ・ 複合ゲル(80%)

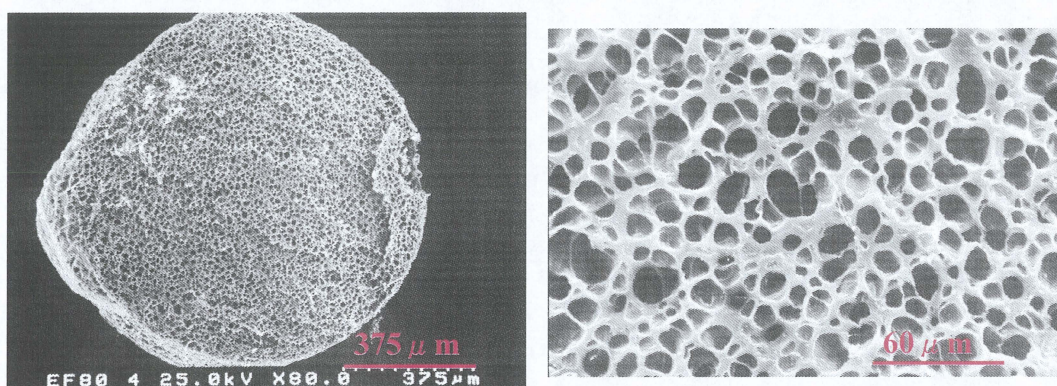


Fig.3-12 複合ゲルの断面構造(エラスチン比率 80% 左:80倍 右:500倍)

- ・ 複合ゲル(70%)

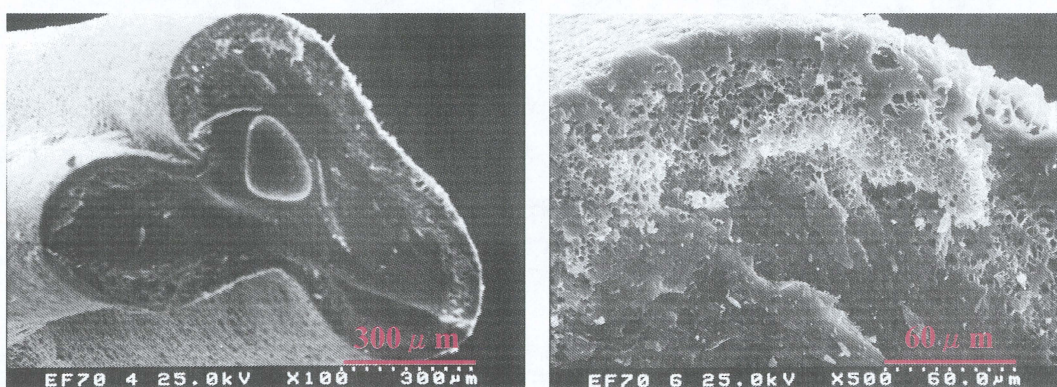


Fig.3-13 複合ゲルの断面構造(エラスチン比率 70% 左:100倍 右:500倍)

- ・ 複合ゲル(65%)

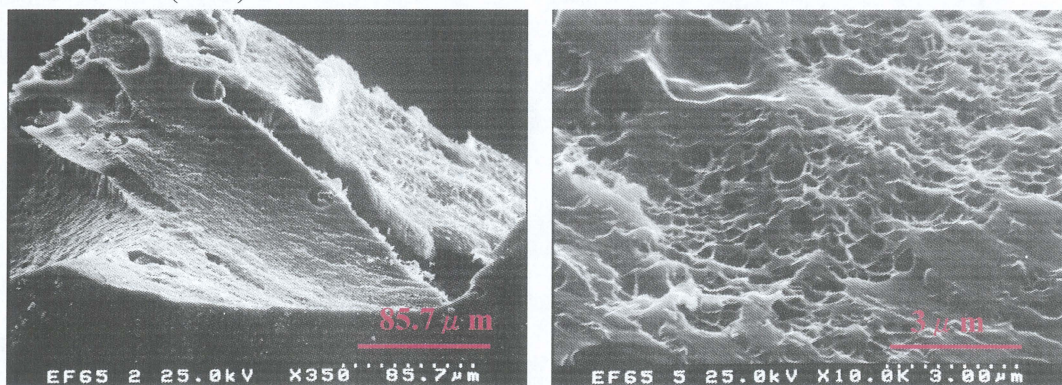
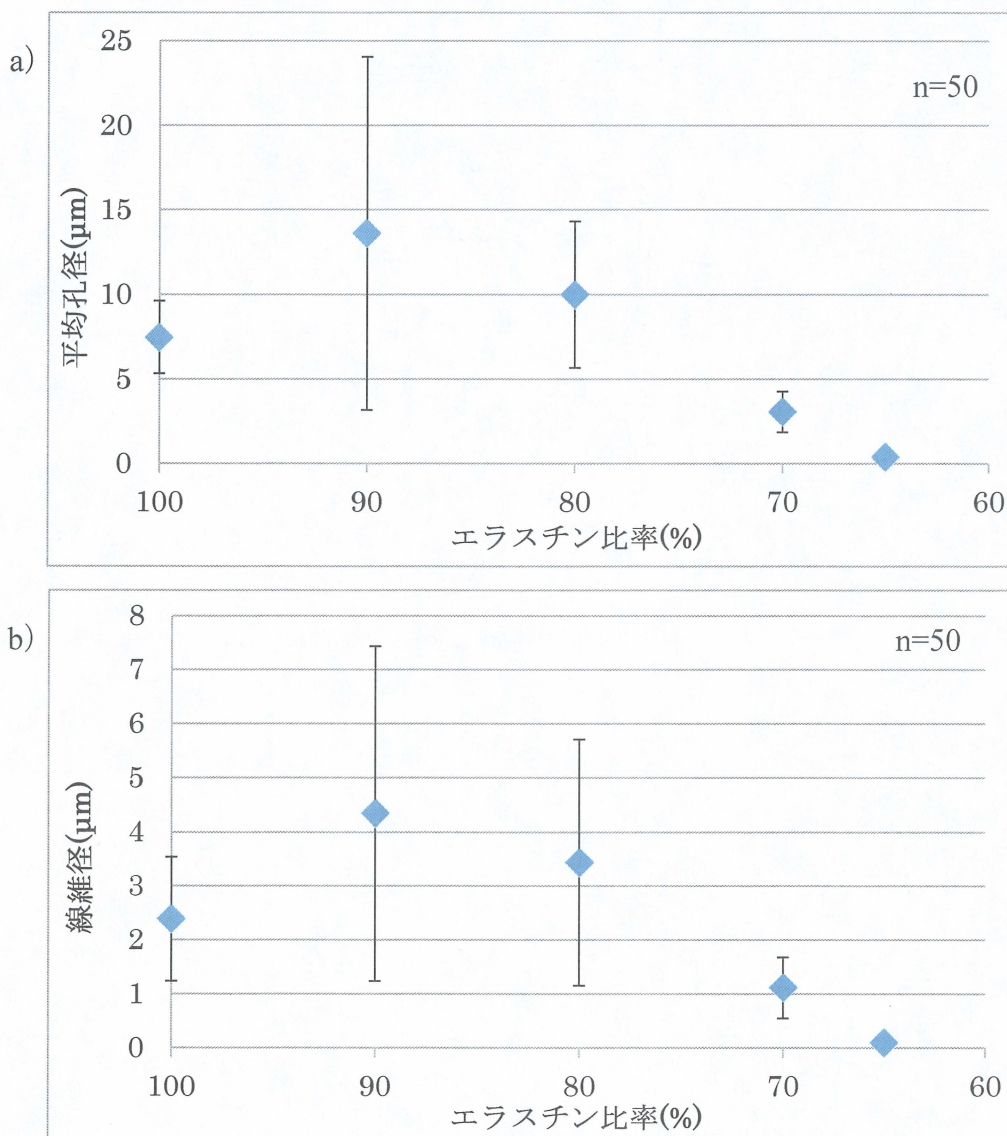


Fig.3-14 複合ゲルの断面構造(エラスチン比率 65% 左:350 倍 右:10000 倍)

これらの画像を解析し、ゲルの平均孔径、線維径、空隙率を算出した。



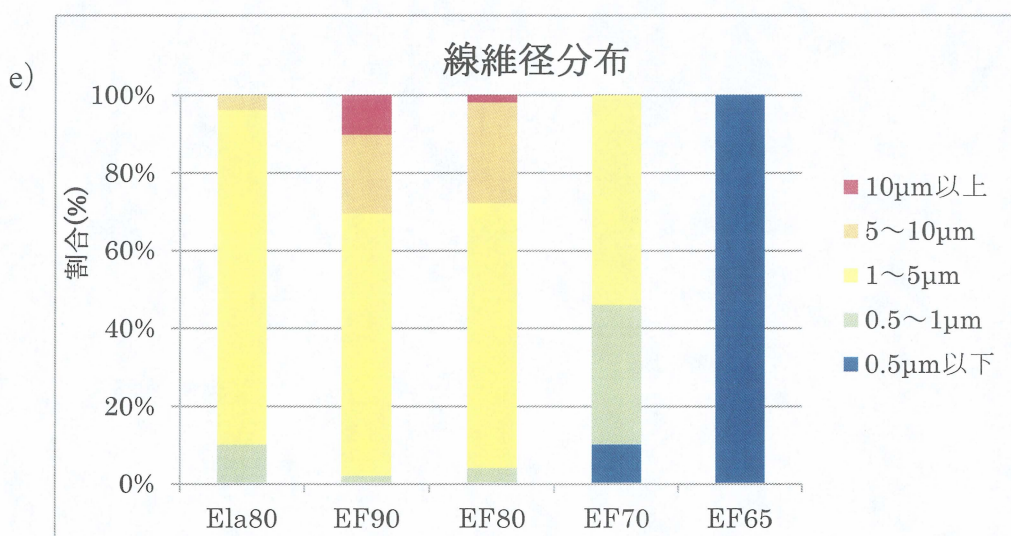
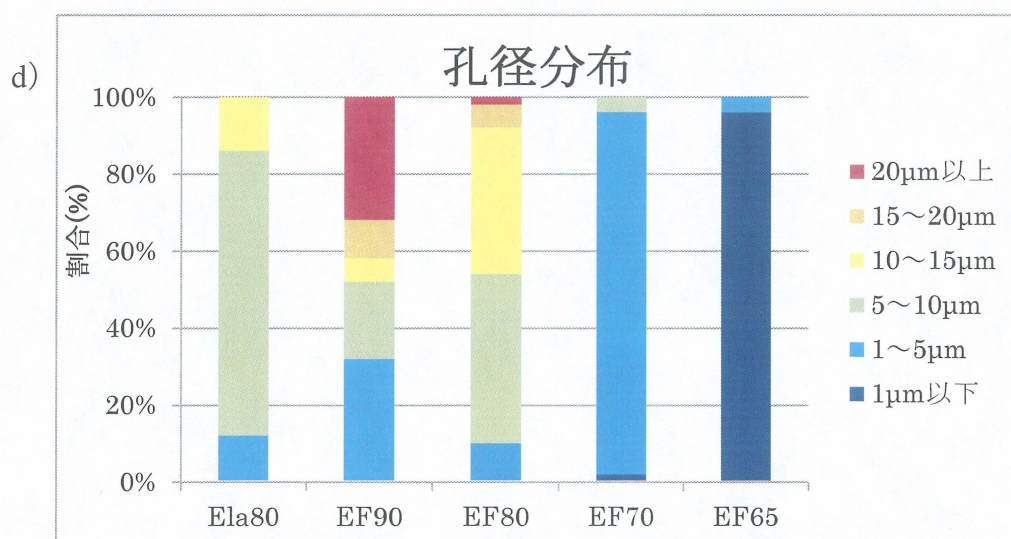
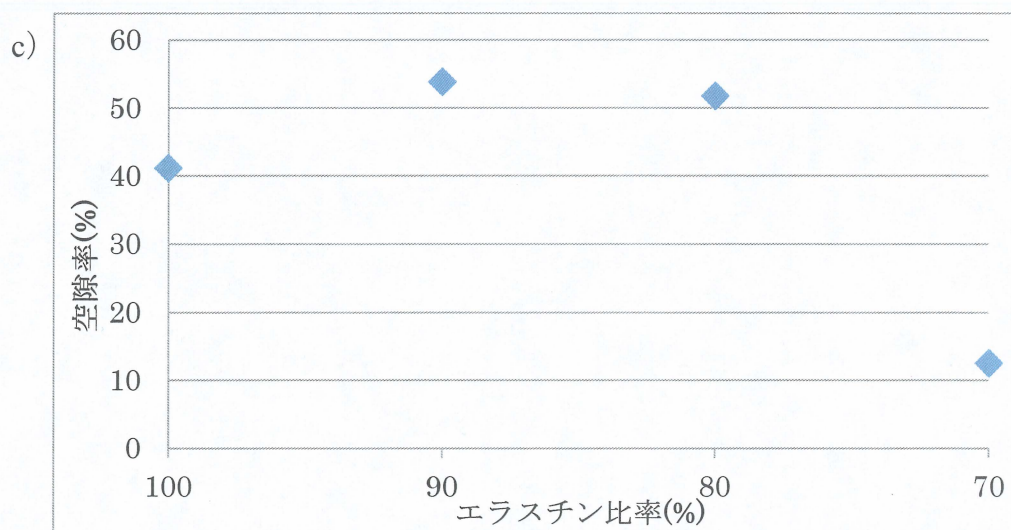


Fig.3-15 複合ゲルの表面解析

作製したIV型複合ゲルはエラスチン比率が下がるにつれて平均孔径・線維径・空隙率は全て減少していく傾向があった。(Fig.3-15a、b、c)また、エラスチン比率が高いものほど、孔径や線維径は不均一で、孔径や線維径が大きいもの・小さいものも同様に存在した。(Fig.3-15d、e)しかし、100% エラスチンゲルでは孔径・線維径ともに均一で、IV型複合ゲル(エラスチン比率 80%)と比較した時に全て低い値を取ることがわかった。

エラスチン比率 70、65%のIV型複合ゲルは穴が存在している部位と穴がほとんど存在しない部位に分かれていた。(Fig.3-13、14)しかし、エラスチン比率 65%複合ゲルにおいて、縦に裂けた部位から $1\mu\text{m}$ 以下の孔が多く見つかった。

4 章 考察

・ フィブリリンの抽出

水溶性フィブリリンの原料となる不溶性エラスチンを構成しているものは、ほとんど弾性線維関連のタンパク質であり、エラスチンやフィブリリンが多くを占めている。そこからエラスチンを取り除いたものが不溶性フィブリリンであるため、その多くがフィブリリンであると思われる。しかし、水溶性フィブリリンの収率は約 2 割だった。

(Table.3-1)

その原因として考えられるのが、フィブリリンの酸化である。不溶性フィブリリンに 2-メルカプトエタノールを加えた pH 8.5 Tris-HCl で一晩攪拌した後に得られた溶液に対して透析を行うが、その際溶液はほぼ透明の溶液となっている。このことから不溶性フィブリリン自体は還元剤でほとんどが溶ける物質であると考えられる。しかし、透明の溶液は透析中に段々と濁ってくる。これは溶液中に含まれていた 2-メルカプトエタノールが無くなり、入ってくる脱イオン水中の酸素により酸化が起こり、溶けていたフィブリリンが元の不溶性フィブリリンに戻ってしまったのだと思われる。

・ フィブリリンの同定

水溶性フィブリリンのアミノ酸分析において、システインがほとんど検出されなかった。(Fig.3-2)システインはフィブリリンには多く含まれているアミノ酸であるが、アミノ酸分析を行った結果は 0.47%だった。通常のアミノ酸分析ではシステインが測定できないと考え、水溶性フィブリリンに対し、過ギ酸処理を行った後に再度アミノ酸分析を行った。しかし、検出されたシステインの量は 2.1%で、理論値である 13%と比べるととても低い値だった。

不溶性フィブリリンを還元剤で処理した時に溶解することが確認されている。このことは不溶性フィブリリン内のジスルフィド結合の切断が行われている事を示唆する。そのため、不溶性フィブリリン中にはまだシステインが存在すると思われる。

また、抽出過程の透析中に濁りが発生してくる。この濁りが発生する理由がシステインの酸化によるジスルフィド結合再形成だと思われる。しかし、水溶性フィブリリンとして抽出できるものもあるため、含まれているフィブリリンには酸化しやすいものとしにくいものがあると思われる。酸化しやすいものは透析中に不溶性に戻り、酸化しにくいものは水溶性フィブリリンとして抽出できる。(Fig.4-1)この違いの原因となるのがシステインなどのアミノ酸だと考えている。酸化しやすいものには多くシステインが含まれ、酸化しにくいものはシステインが少ないものとなっていると思われる。

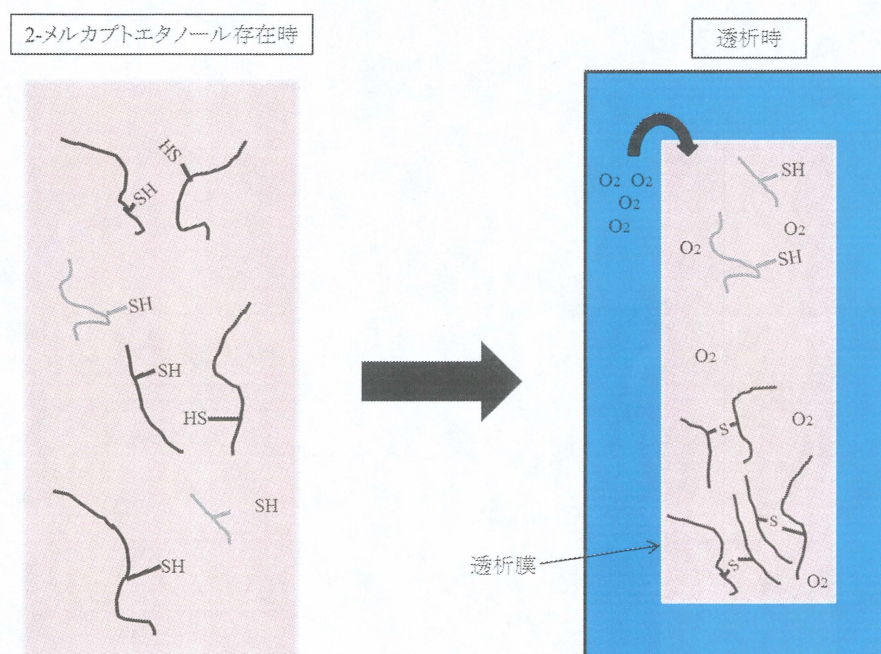


Fig.4-1 透析中におけるフィブリリンの変化

・ エラスチン・フィブリリン間の相互作用

本研究では水溶性エラスチン抽出中に析出する不溶性フィブリリンから、水溶性フィブリリンを抽出している。この不溶性フィブリリンは、酸処理の回数が増えるにつれて性質が変化していく。始めは黄味がかった白色でさらさらとした沈殿物が析出し、析出する量も多い。しかし、酸処理を重ねていくと沈殿物の量が減り、色が茶色に近くなっていく。そして、ある段階から沈殿物の量が急激に増し、茶色い粘着質な塊が析出する。(Fig.4-3)

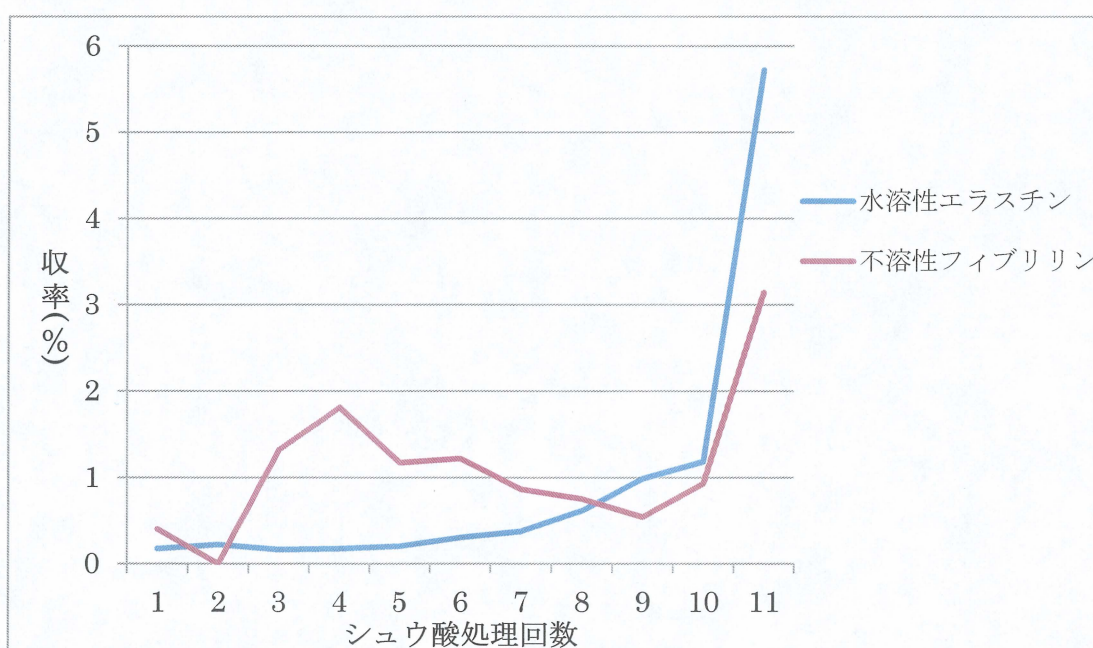


Fig.4-2 水溶性エラスチンと不溶性フィブリリンのクエン酸処理回数ごとの収率¹²⁾

析出する沈殿物は不溶性フィブリリンだと考えている。しかし、酸処理の回数が増えるだけで不溶性フィブリリンの性質が変化するとは考えにくい。そのため、この沈殿物の性質変化はエラスチンとフィブリリン間の相互作用が原因だと思われる。

エラスチン抽出の特徴として水溶性エラスチンは始めが少なく、終わりに近づくほど収率が上がっていく。(Fig.4-2)また、不溶性フィブリリンは始めが多く、途中からほとんど取れなくなるが、終わりが近づくともた量が増える。しかし、終了間際の不溶性フィブリリンはその性質が全く異なっていることから、そのほとんどがエラスチンで構成されていると思われた。この不溶性フィブリリンを脱イオン水で洗浄したところ、多量の水溶性エラスチンが抽出できた。つまり、フィブリリンには高濃度のエラスチンが存在するときに、フィブリリン自体にエラスチンを集めさせる機能がある事が示

唆された。この機能は生体内で起きているマイクロフィブリルへのトロポエラスチン沈着と類似している。

エラスチンとフィブリリンを 95:5 の比率で混合した時に、透過光強度が急激に減少することが示された(Fig.3-4、5)。これはフィブリリンへのエラスチン沈着が生じたことにより、粒子が大きくなり、白濁したと考えられる。このことから、フィブリリンにはエラスチンを集めさせる機能があることが示唆された。

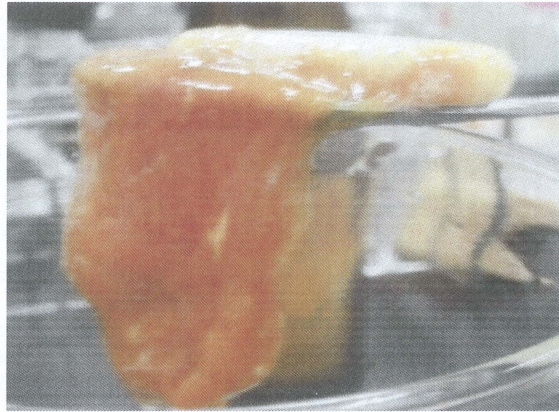


Fig.4-3 酸処理終了間際の沈殿物

・ エラスチン凝集による弾性率への影響

ゲルを作製するときに、一度エラスチン溶液を加熱し凝集させると弾性率・伸長率ともに増加した(Fig.3-7)。この現象は弾性線維形成にもとづく現象だと思われる。

エラスチンは弾性線維が形成される際にマイクロフィブリルへと沈着してから架橋を形成し、弾性線維になる。その際に、エラスチンは凝集してから沈着するといわれている。⁴⁾この現象が必要な原因はトロポエラスチンの粒子が凝集することにより大きくなるのがマイクロフィブリルへの沈着に関係しているからだと思われる。そのため、エラスチンを凝集させた場合とさせてない場合の違いとしては粒子の大きさが異なることが推測される。粒子が大きくなることにより、フィブリリンへの沈着しやすさが高くなる。(Fig.4-4)それによってフィブリリンとの相互作用が高くなり、ゲルの力学的強度が増加したと思われる。また、この現象にはエラスチン濃度も大きく関係している。エラスチン濃度が高い時には、高温でないとエラスチン凝集が起きず、高すぎた時にはゲル化が進んでしまう。そのため、エラスチン濃度を凝集しやすい環境に整えることがエラスチンとフィブリリン間で高い相互作用を生むためには必要だと思われる。

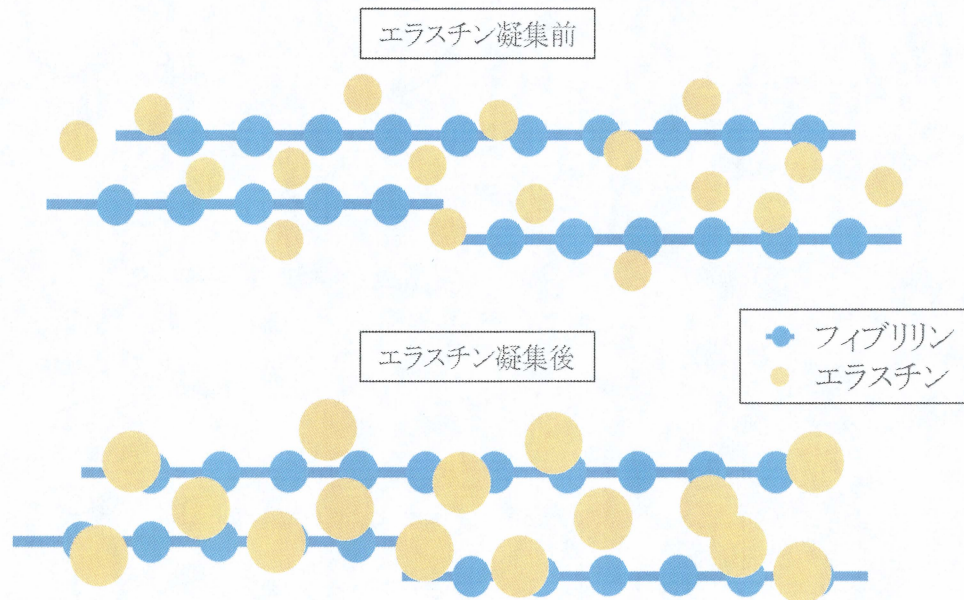


Fig.4-4 凝集後の構造変化

・ 架橋剤を両溶液へ添加することによる弾性率への影響

架橋剤をエラスチンとフィブリリン両溶液へ添加することによって、力学的強度が変化した(Fig3-9)。この原因の一つとして、エラスチンのアミノ基量に関係していると考えられる。エラスチンはリシン、ヒスチジン、アルギニンのようなアミノ基を持つアミノ酸を元来多く持っていない(Table.3-2)。リシンはエラスチン中に存在しているが、トロポエラスチンからエラスチンに成熟する際に、リシルオキシダーゼにより使用されデスモシン架橋を作っている。このデスモシンは水溶性エラスチンとして抽出される時に、分解はされていないと思われる。そのため、リシンはアミノ酸分析を行っても検出されない。

本実験で架橋剤の量を変化させたゲルを作製した時に、エラスチンの弾性率にほとんど影響を与えなかった。実験で使用した Dode-DSP と EGDE はアミノ基に反応してゲルを形成する。Dode-DSP を使用した時にエラスチンゲルの弾性率に影響がなかったことから、架橋倍率が 2 倍以上加えた時点でエラスチン中のアミノ基は反応しきったと考えられる。それ以上架橋剤を加えた時に、フィブリリンにも架橋剤が作用し、力学的強度に変化が生じたと推測される。また、架橋剤が少ない時にフィブリリンを加えても力学的強度に変化はなかった。そのため、ゲルが形成される時にエラスチン>フィブリリンの順に架橋が進むと考えられる。しかし、架橋剤が多い時にはエラスチン-エラスチン間、エラスチン-フィブリリン間、フィブリリン-フィブリリン間の 3 つの架橋が存在することにより、強い構造を作っていると思われる。(Fig.4-5)この時、フィブリリンは弾性線維のようにエラスチンを覆うようにして存在し、その間で結合していると思われる。

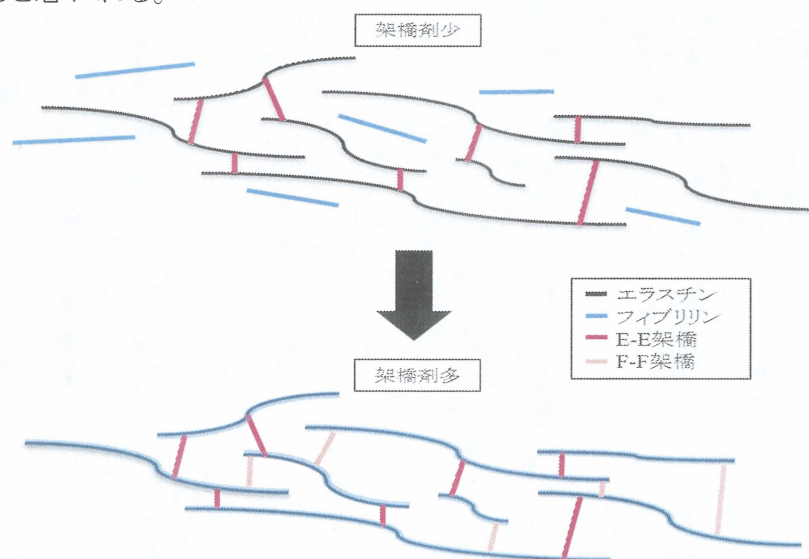


Fig.4-5 架橋剤を加えたことによるゲルへの影響

もう一つの原因として弾性線維形成過程に注目した。弾性線維はフィブリリンの重合体であるマイクロフィブリルにトロポエラスチンが沈着し、そのうえで架橋を形成してエラスチンへと成熟する。この現象はトロポエラスチンが架橋しやすいようにマイクロフィブリルがトロポエラスチンを配列させていると考えられている。³⁾そのため、本実験でフィブリリンのアミノ基分も架橋剤を加えたことにより、フィブリリンがマイクロフィブリル状に変化し、より効率的にエラスチンの架橋が進んだと推測される。

また、タンパク質量や架橋剤が多いと固くなるが伸びにくいゲルができることを予想していた。しかし、結果的に高強度・高伸長のゲルを作り出すことができた。この性質は生体内のエラスチンとフィブリリンの関係性に似ている。エラスチンはフィブリリンと生体内で同じ弾性線維に存在しているが、この時にフィブリリンは基本的にエラスチンが伸びることを妨げない構造を取っていると考えられる。

生体内でフィブリリンは末端で結合し、直線状に構造を作っていく。それにより、少しではあるが伸びる構造を取る。しかし、限界点まで伸びると戻らず伸びきった構造を取ってしまう。³⁾この構造がエラスチンによって改善されることにより、高強度・高伸長率が実現したと考えられる。本来ならば、伸びきったところでフィブリリンは止まってしまうが、エラスチンが存在することにより元に戻るためのゴムがついたのと同じ効果がついたと考えられる。また、エラスチンにおいても周りを伸びる高強度の材料が覆う事で弾性率が増加したと考えられる。(Fig.4-6)そのため、この結果はエラスチンとフィブリリンの両タンパク質が自身に足りないものを補いあうことで得られた結果であり、どちらのタンパク質が欠けても得られないと思われる。

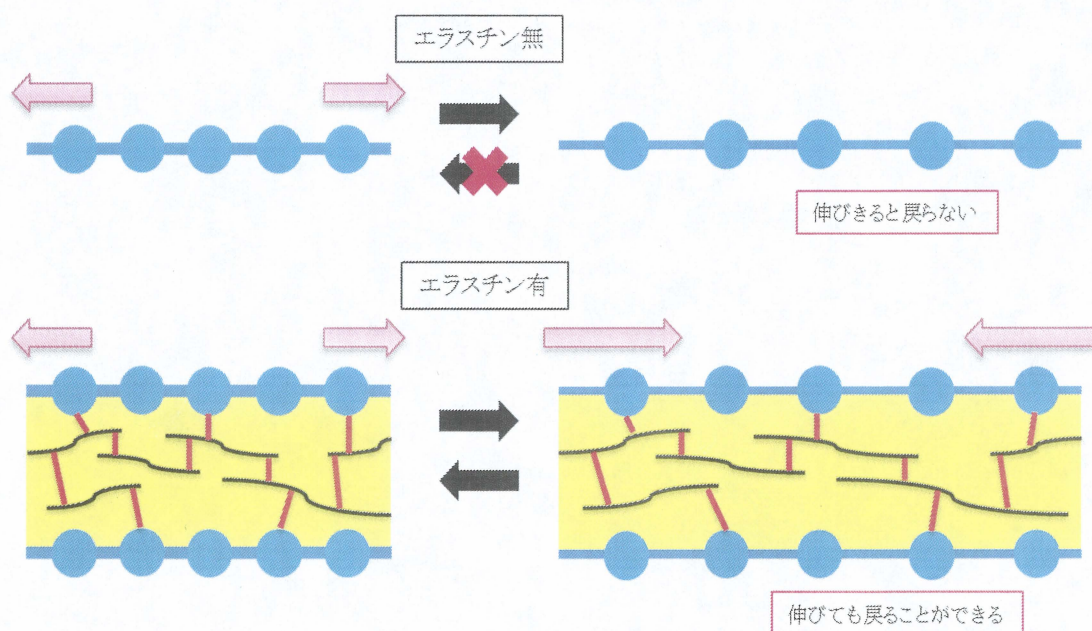


Fig.4-6 エラスチンとフィブリリンの構造

・ 架橋剤による弾性率・伸長率への影響

本研究ではEGDEとDode-DSPという2種類の架橋剤(Fig.4-7)を用いて複合ゲルを作製した。EGDEとDode-DSPで作製した複合ゲルの間には弾性率では大きいもので約100kPaの差があり、また伸長率ではより差が大きく100から200%もの差があった(Fig.3-9)。

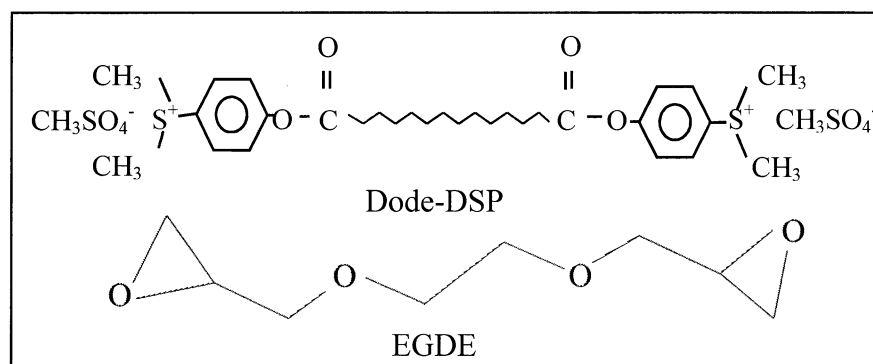


Fig.4-7 架橋剤の構造¹¹⁾

2つの架橋剤の違いとしてEGDEは親水性の架橋剤で、Dode-DSPは疎水性の架橋剤という違いがある。以前に行われた研究でエラスチンゲルにおいて、Dode-DSPを用いたゲルでは弾性率は低い、高い伸長率を持つことができること、EGDEを用いたゲルでは高い弾性率を持つが、伸長率が低くなることが示された。その理由としてEGDEは親水性であるため、ゲル全体に架橋剤がいきなりプラスチックのような構造になってしまったために固いがほとんど伸びないゲルができ、Dode-DSPは疎水性であるため、ゲル内に局所的に架橋剤が存在する事でゴムのような構造になったために固くはないが伸びるゲルができたことが推測された。¹⁰⁾しかし、本研究で作製した複合ゲルはこの推測には完全には当てはまらない。結果としてIV型複合ゲルは高弾性率・高伸長率を持つことができた。その差はフィブリリンが大きく影響していることが示唆された。

3-5より、フィブリリンはDode-DSPとEGDEどちらの架橋剤を用いてもゲル化することができた。しかし、どちらのゲルも伸びることはできない固いゲルだった。二つの架橋剤のうち、Dode-DSPに存在しているアルキル基はデスモシンに近づいていく性質がある。そのため、エラスチン内でDode-DSPは、デスモシン近辺で架橋していると予測している。しかし、デスモシンの無いフィブリリン内ではDode-DSPはEGDEと同様に全体にいきわたって架橋していると思われる。そのため、固いが伸びないゲルができたと思われる。また、Dode-DSPはエラスチンの凝集性を変化させる。Dode-DSPを加えたエラスチン溶液は凝集温度が上昇する。¹³⁾つまり、凝集する

ために必要なエネルギー量が上昇するという事である。そのため、Dode-DSP が存在するときには凝集した時の粒子形が大きくなることが推測される。それにより、フィブリリンとの相互作用も上昇し、より効率よくゲル化することで高弾性率・高伸長率のゲルを作ることができたと思われる。これらのことから高弾性率・高伸長率を持つゲルを作製するためにはエラスチン・フィブリリンどちらのタンパク質も必要不可欠である事が示唆された。

また、エラスチンゲルにおいても架橋剤の量によって変化が見られた。EGDE は加えるほど弾性率が増加したが、Dode-DSP はほとんど弾性率・伸長率に変化はなかったが、過剰に入れすぎた時に弾性率は減少し、伸長率が増加した。この差の原因として二つの架橋剤の架橋部位の違いがある。両架橋剤ともアミノ基に反応するが、EGDE は他にもカルボキシル基や EGDE 自身にも反応することができる。そのため、エラスチンのアミノ基が反応しきった後にも、他の反応基と反応を起こし、ゲルの強化を行っていたと思われる。また、Dode-DSP 過剰の時にはエラスチン溶液中で Dode-DSP が相分離してしまった可能性が考えられる。そのため、作製したエラスチンゲル内に使用されていない Dode-DSP が洗浄時に流れだしたと思われる。それによりゲル内の空孔が大きくなり、弾性率が減少、伸長率が増加したと思われる。

・ フィブリリンによるゲル構造への影響

作製したIV型複合ゲルとエラスチンゲルを比較した時に、複合ゲルの平均孔径や線維径がエラスチンゲルよりも大きい傾向があった。(Fig.3-15a、b、c)全てのゲルにおいてエラスチン量は変わらない。そのため、ゲルの基本構造はエラスチンを基礎としている。そこに添加したフィブリリンが関わってくると考えられる。複合ゲルにおいて線維径が増加した原因がフィブリリンだと推測している。

フィブリリンとエラスチンは相互作用している。フィブリリンが少量の時はエラスチンと直接作用し、エラスチンの線維にコーティングするようにゲルが出来ていくと思われる。それにより、複合ゲルの線維が太くなっていくと考えられる。そしてフィブリリンと架橋剤の量が増え、エラスチンに含まれるアミノ基が完全に使用されるとフィブリリン同士が架橋し合う。それにより、複合ゲルに存在する穴は小さくなっていき、穴が存在する部分の線維径は細くなっていく。また、フィブリリン比率が上昇すると穴が架橋で埋まり、ほぼ穴のない構造が見られるのもこの影響だと考えられる。

また、エラスチン比率が高い時にゲルの孔径が不均一なゲルだった。(Fig.3-15d)これはエラスチンとフィブリリンの結合位置が原因だと思われる。トロポエラスチンはフィブリリンのドメインのうち、2番目の 8-cys ドメインに結合すると考えられている。(Fig.1-5)¹⁴⁾そこに、さらにいくつものトロポエラスチンが集まり、相互作用を起こしている。そのため、フィブリリンが少量の場合にはエラスチンに偏りが生じ、エラスチンが均一に存在しなかったために孔径の大小が生じたと思われる。

フィブリリン比率が高いゲルを観察した時に、ほぼ穴のない構造が見られるが、縦の断面を観察したときに穴や線維を観察することができた。1 μm 以下の穴が多く存在しているのが確認できた(Fig.3-14)。そのため、複合ゲルの内側には細かい線維のネットができている影響により、高弾性率・高伸長率を生み出すことができていると思われる。

・ 今後の展望

本研究ではエラスチンとフィブリリンを組み合わせた複合ゲルを作製することにより、高弾性率・高伸長率の材料を作ることができた。これは生体組織の弾性線維と比べても同様の値といえる。(Table.1-1)しかし、そのIV型ゲルは架橋剤の濃度が高く、細胞毒性がある可能性も考えられる。そのため、よりエラスチンとフィブリリンの相互作用が高い濃度を決め、架橋剤で強度調節を行うのがよいと思われる。方法としては、架橋剤の量を一定としてエラスチンとフィブリリンの比率を変えたゲルを作製し、弾性率・伸長率を測定する。これにより、濃度比率を決定し、ゲルを作製するのがよいと思われる。

IV型ゲルを SEM で観察した時に、IV型ゲルは多孔質なゲルである事がわかった。そのため、このゲルを用いた細胞包埋ゲルを作製する事も可能だと思われる。それにより、大動脈の弾性板を再現した人工材料を作製できる可能性が示唆された。これから最終的に人工血管を作り出すことが理想である。そのために必要とされるのが、より強度を持たせるための外膜に相当する材料である。

以前に行われた研究でコラーゲンを用いた配向シートを作製することにより、高強度材料を作製することに成功した。¹⁵⁾本研究で作製したエラスチン・フィブリリン複合ゲルとこのコラーゲンシートを合成することによって、より生体に近い人工血管を作ることができるとと思われる。(Fig.4-8)しかし、問題点として弾性組織とコラーゲンをつないでいる存在がまだ解明されていない。そのため、人工血管を最終的に作り上げるためには複合ゲルとコラーゲンをつなぐ方法を模索する必要性が高い。

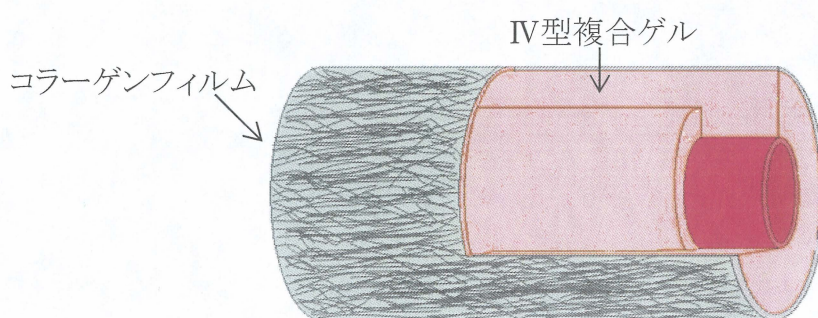


Fig.4-8 三層構造人工血管

5 章 結論

- 水溶性エラスチン作製中に析出する不溶性フィブリリンから水溶性フィブリリンを抽出できた。
- エラスチンとフィブリリンを混合し、エラスチン・フィブリリン複合ゲルが作製できた。また、両タンパク質のアミノ基分 Dode-DSP を加え、弾性線維を再現する事により、高弾性率・高伸長率の複合ゲルを作製できた。
- 複合ゲルを SEM で観察した時に、エラスチンゲルと複合ゲルの違いが確認できた。また、複合ゲルにおいてフィブリリン比率が増加するにつれて、断面に存在する孔や線維が小さくなっていく傾向があることがわかった。

謝辞

本研究、修士論文作成を進めていく中で、多くのご指導・ご鞭撻をいただき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 堀内孝教授、宮本啓一准教授に深く感謝致します。特に宮本先生には研究においてアドバイスだけでなく、実験を行うための試料をいただくこともあれば、実験装置が壊れた際には修理していただくこともあり、本当にお世話になりました。先生がいてくださったことで、この研究に取り組むことができたと思います。心より深く感謝致します。

また、研究への取り組み方から研究室での生活まで多くのご指導や助言をいただきました水谷 直紀先輩、同じ ECM をテーマとし、直属の先輩として実験の指導をしてくださった熊澤 雄基先輩、また同じエラスチンをテーマとする境 淳志君、中村 雅弘君には深く感謝致します。エラスチンのクエン酸処理に際し、手伝ってくださった同期の田野 裕美さん、M1 の長谷川 まりなさん、中町 信敏君、B4 の傍島達也君、堀江 俊貴君、水田 裕磨君、山田 将義君、丸一日がかりの実験でご迷惑をおかけしました。

そして 3 年間の研究生活を共に過ごした阿部 功児君、葛本 智淳君、丹羽 一喜君、原 拓也君、研究室生活や実験において様々な問題がありましたが、共に悩み、励まし合い、ここまで来ることができたことを本当にうれしく思います。多くのご迷惑をおかけしましたが、本当にお世話になりました。

最後になりましたが、生体材料化学研究室で過ごすことができたこの 3 年間は私の中で本当に貴重でした。このような経験をさせていただき、本当にありがとうございました。今後もこの研究室がより一層繁栄していくことを心より願っています。

平成 25 年 3 月
神谷 歩

7 章 参考文献

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 矢嶋 俊彦,*et al*: 歯周組織の弾性系線維. *日歯周紙*, 2004;46:175-184
- 4) Fumiaki Sato, *et al*: Distinct Steps of Cross-linking, Self-association, and Maturation of Tropoelastin Are Necessary for Elastic Fiber Formation. *J.Mol.Biol*, 2007; 369: 841-8513
- 5) Stuart A. Cain, *et al*: Biomolecular analysis of elastic molecules. *Methods*, 2008; 45: 42-52
- 6) Ming-Chuan Wang, *et al*: Fibrillin Microfibrils: A Key Role for the Interbead Region in Elasticity. *J.Mol.Biol*, 2009; 388: 168-179
- 7) P.A Handford, *et al*: Fibrillin: from domain structure to supramolecular assembly. *Matrix Biology*, 2000; 19: 457-470
- 8) Francesco Ramirez, *et al*: Biogenesis and function of fibrillin assemblies. *Cell Tissue Res*, 2010; 339: 71-82
- 9) Mieke M.J.F. Koenders, *et al*: Microscale mechanical properties of single elastic fibers: The role of fibrillin-microfibrils. *Biomaterials*, 2009; 30: 2425-2432
- 10) Timothy M. Trask, *et al*: Interaction of Tropoelastin with the Amino-terminal Domains of Fibrillin-1 and Fibrillin-2 Suggests a Role for the Fibrillins in Elastic Fiber Assembly. *BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2000; 275: 24400-24406
- 11) 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
- 12) 神谷 歩/弾性細胞外基質フィブリリンの抽出に関する研究/平成 22 年度卒業論

文

- 13) 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
- 14) Matthew J. Rock, et al: Molecular Basis of Elastic Fiber Formation. BIOLOGICAL CHEMISTRY, 2004; 279; 23748-23758
- 15) 熊澤 雄基/組織工学的な人工血管のための高強度コラーゲン材料の開発/平成 23 年度修士論文
- 16) 長谷川 まりな/機能性低分子エラスチンの開発/平成 23 年度卒業論文

付録

・ 水溶性エラスチンの分画

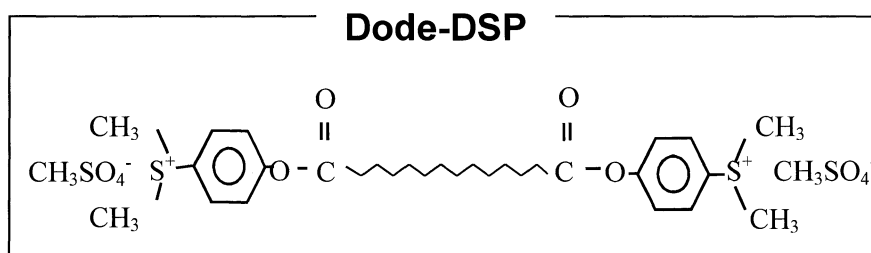
当研究室では 2 種類の方法により、抽出できた水溶性エラスチンを評価、分画している。弾性率と凝集温度、この二つの結果を組み合わせることで同じ品質の水溶性エラスチンを得ている。

弾性率測定

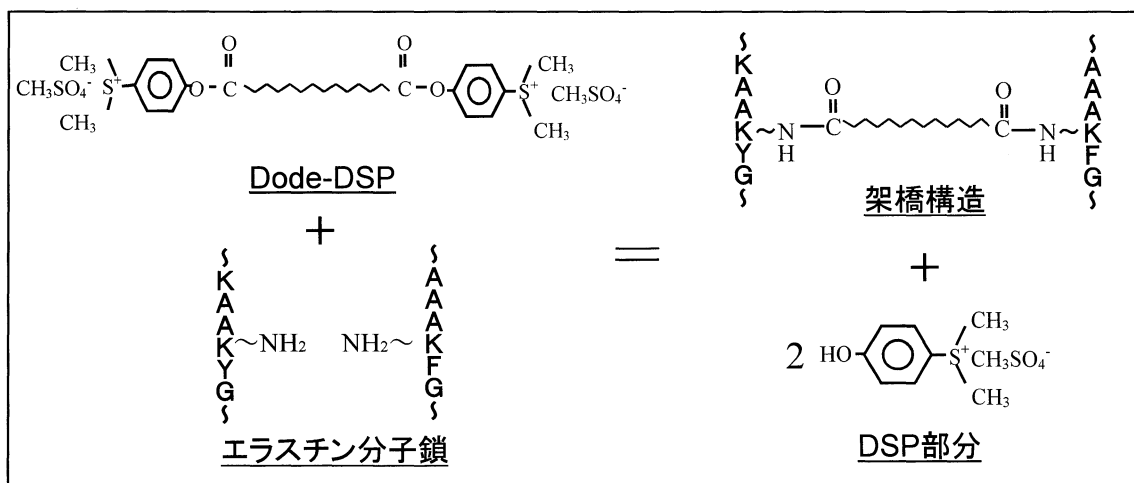
1. エラスチンハイドロゲルの作成

熱シュウ酸処理によって架橋構造を分解した水溶性エラスチンをハイドロゲルにする為には、エラスチン溶液に架橋剤を加えて再度架橋する必要がある。

本実験では、架橋剤として Dode-DSP を選択した。



付録 1 架橋剤 Dode-DSP の構造 ⁸⁾



付録 2 Dode-DSP とエラスチン鎖の架橋反応 ⁹⁾

【試薬・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)
- ・循環恒温水槽 (LAUDA)
- ・オートクレーブ IST-150 (Pasolina)
- ・インキュベータ IC-450PC (AS ONE)

【実験操作】

- 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 (2000rpm・3min) を行い、脱気した。
- ② 脱気したエラスチン溶液を 2.5cm 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 (1500rpm・3min) を行い、脱気した。
- 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 分加熱した。
- 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 分加熱した。
- 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 18 時間洗浄した。

2. 弾性率測定

エラスチンは細胞外マトリックスの中でも特に弾性に優れた成分であり、その構造を保持したエラスチンハイドロゲルにもその性質は引き継がれていると思われる。

本実験では作成したエラスチンゲルの弾性率測定を行って、その弾性率の違いから水溶性エラスチンの分画を行った。

[弾性率(ヤング率)の求め方]

断面積 $A(\text{m}^2)$ の物体を一軸方向に力 $F(\text{N})$ で引き伸ばし、物体の長さが $l_0(\text{m})$ から $l(\text{m})$ へと変形した時、その時の応力 $\sigma(\text{Pa})$ と歪 γ は次の式で求められる。

$$\sigma = F / A$$

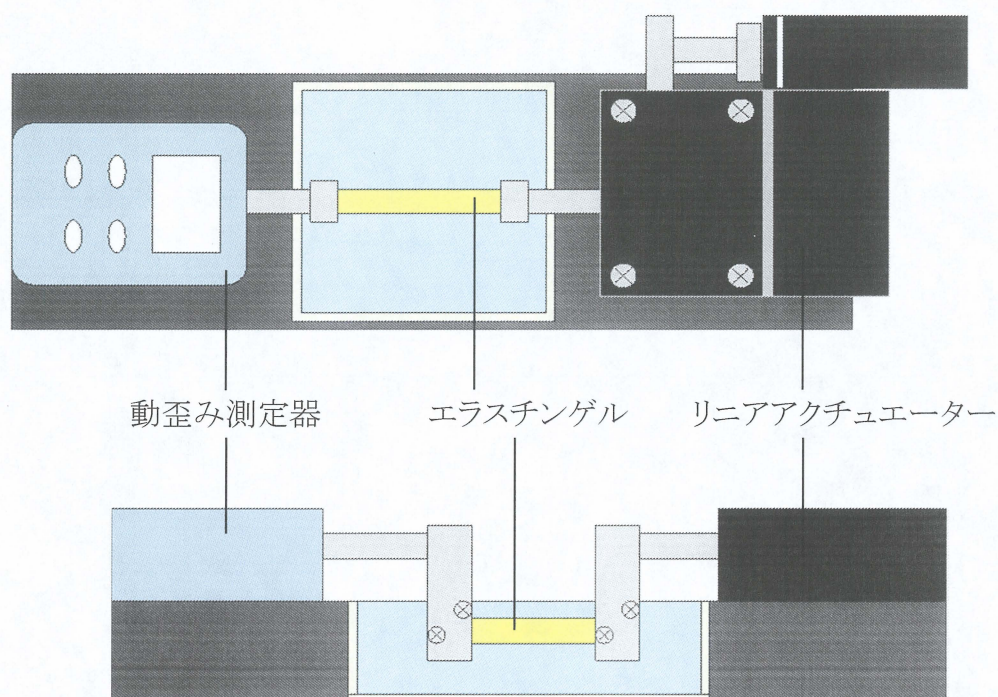
$$\gamma = (l - l_0) / l_0$$

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

$$E = \sigma / \gamma$$

【試薬・機器】

- ・エラスチンハイドロゲル
- ・弾性率測定装置
- ・アナログ計測計算機(アズワン)



付録3 弾性率測定器

【実験操作】

- ① 1.5cm 程度に切ったエラスチンゲルの両端にスペーサーを付け、弾性率測定器で挟み、固定した。
- ② 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し、その時のスペーサー間のゲルの長さを自然長とした。
- ③ 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た。
- ④ 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、弾性率を求めた。また、自然長と破断時のゲル長から伸びを求め、そこから伸張率以下の式より求めた。

$$\text{破断時の伸び (m)} / \text{自然長 (m)} \times 100 = \text{伸張率 (\%)}$$

- ⑤ 水溶性エラスチンのクラスを弾性率によって以下のように定義し、測定した水溶

性エラスチンの分画を行った

	A	B	C	D	E
弾性率 (kPa)	50 以上	50 未満 25 以上	25 未満 5 以上	5 未満	ゲル化しない

凝集温度測定

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。

【試薬・機器】

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

【実験操作】

- ① ねじロ試験管で、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した。
- 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した。
- ③ 恒温槽で溶液の温度を 10 分で 1℃ずつ温度を上昇させ、その時の透過光強度を測定した。
- ④ 水溶性エラスチンのクラスを凝集温度によって以下のように定義し、測定した水溶性エラスチンの分画を行った。

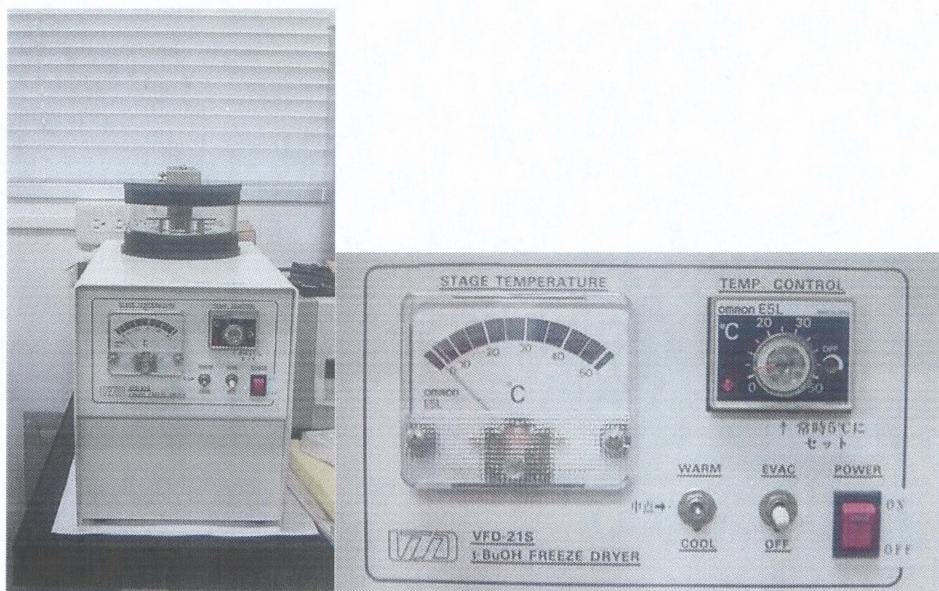
クラス	A	B	C	D	E
凝集温度(℃)	～22.5	22.5～ 25	25～30	30～35	35～

・ 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.)

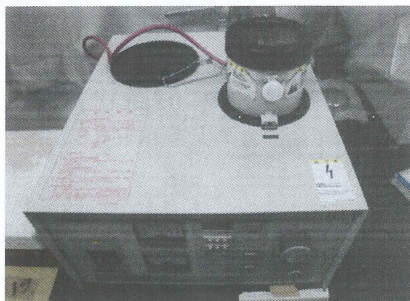


- (1) 後部のトラップコップを水で満たす。
- (2) POWER をオンにし、左のスイッチを COOL に合わせ、内部の温度が 4°C になるまで待つ。
- (3) 4°C になったら予め t-BuOH に浸して凍らせておいたサンプルをサンプル瓶ごと台座にセットし、押さえ蓋を置き、30min 待つ。
- (4) EVAC をオンにし、乾燥を開始する。周囲の氷がなくなるまで待ち、内部までしっかり乾燥させる為、そこから 30min 放置する。
- (5) 30min 経過したら、温度スイッチを WARM に合わせ、温度が 30°C になるまで放置する。
- (6) スイッチを中点に戻した後、EVAC 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。

イオンスパッター使用法

○使用機器

- ・日立イオンスパッターE1010

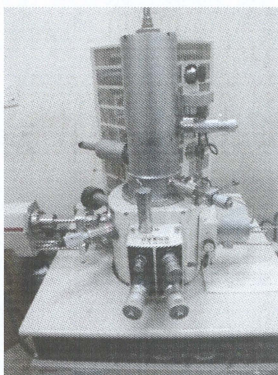


- (1) SEM 用の試料台に両面テープでサンプルを固定する。この時、撮影したい面が上を向くようにし、なるべく平らになるように張り付ける。
- (2) 試料台の裏側(ねじ穴のある側)にシャーペンなどで番号を記入し、サンプルの区別が付くようにしておく。
- (3) 金スパッタリング用の台座にサンプルを試料台ごとセットする。もし台座に空きができるようならテープで塞いでおく。
- (4) イオンスパッターの MAIN VALVE を開き、台座をセットし、POWER をオンにして、圧力が 10Pa まで下がるのを待つ。
- (5) 10Pa になり、Ready のランプが点灯してから 1～2 分待ち、スパッター時間を 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。

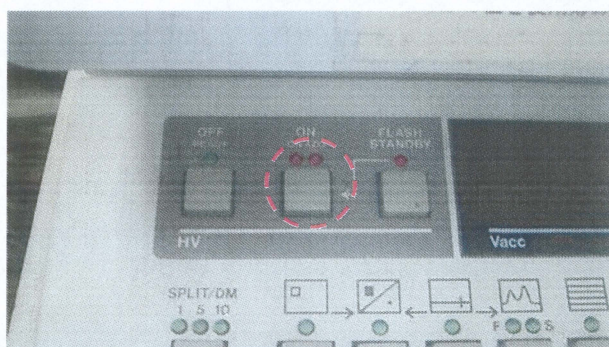
SEM 撮影法

使用機器

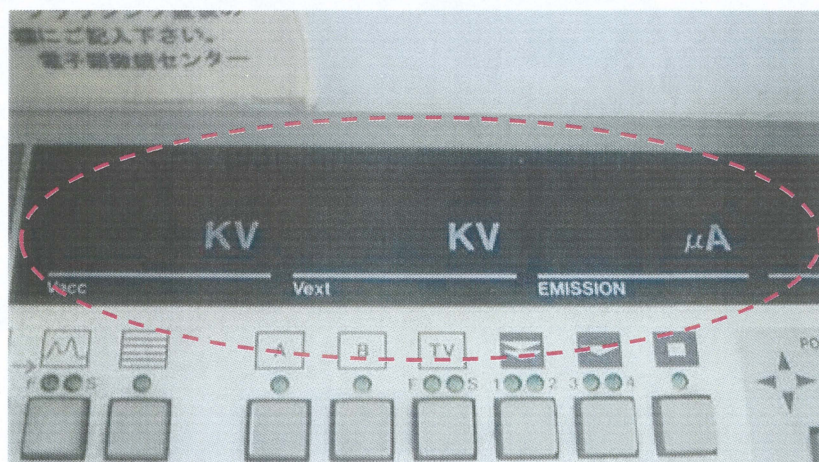
- ・パソコン
- ・日立走査型電子顕微鏡 S4000

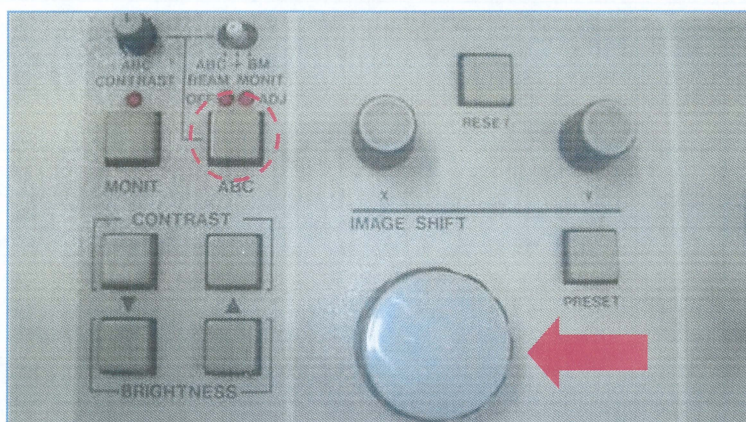


- (1) 撮影前に装置内部の試料台が $x=12.5$ 、 $y=12.5$ 、傾き=0 の位置にある事を確認する。
- (2) displaypower とカメラの電源を入れる。また、パソコンの電源を入れ、EOS utility を起動させる。
- (3) サンプルを高さ調整台に乗せ、固定台と固定する。
- (4) EVAC を押し内部を真空状態にする(基本的に真空状態になっている)。
- (5) 左上部のレバーが CLOSE になっていることを確認してから、AIR を押す。
- (6) 前室部分を開き、固定台を棒にセットする。
- (7) 棒を固定して、前室部分を閉じ、EVAC を押して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

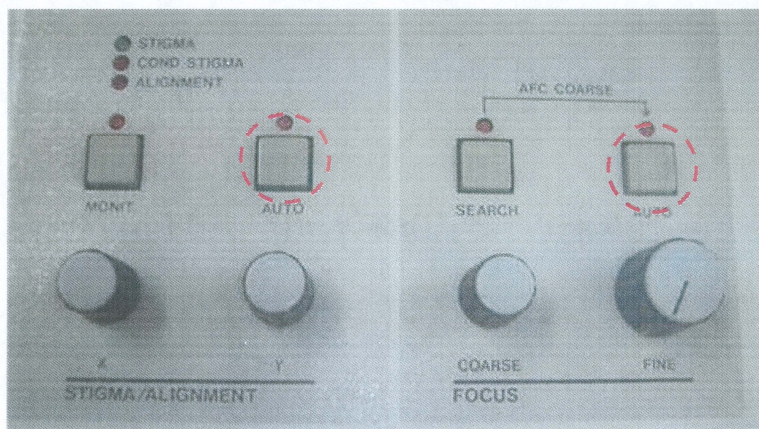


- (11) Vacc、Vext、EMISSION の値がそれぞれ安定したら ABC を押し、画面のコントラストを合わせる。

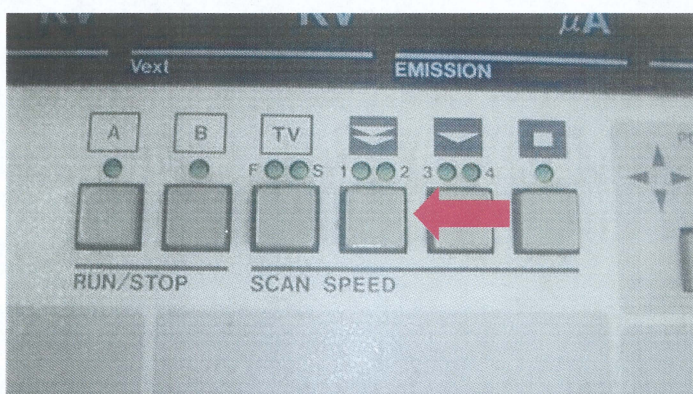




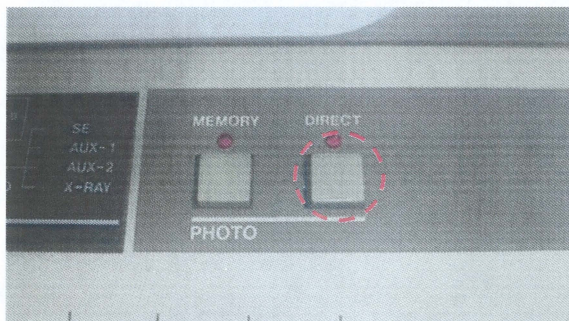
- (12)本体のつまみを回して画像を動かし、サンプルを探す。
 (13)MAGNIFICATION のつまみ(上図矢印)を回し、撮影倍率を決定する。
 (14)STIGMA: AUTO→FOCUS: AUTO の順で押していき、画像のピントを調整する。



- (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。



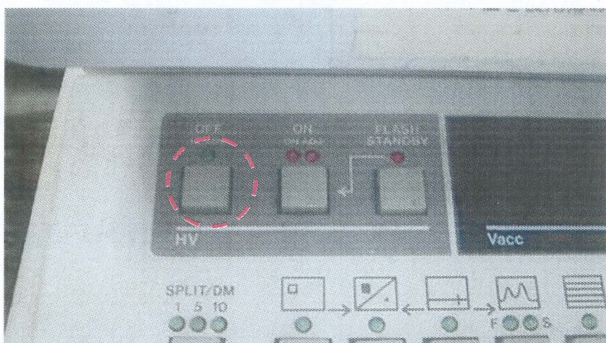
(16)カメラのシャッターを開き、キーボード右上端の PHOTO:DIRECT を押す。



(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。

平均孔径・線維径の算出方法

- (1) Image J を起動した。
- (2) [File]→[Open]と開き、解析する画像を選択した。
- (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同じ直線を引いた。
- (4) [Analyze]→[Set Scale]を選択し、Known Distance の欄にスケールバーの値を入力し、Unit of Length にその単位を入力した。
- (5) 無作為に孔径や線維を直線ツール(Straight line selections)で選択し、[Analyze]→[Measure]をクリックした。
- (6) それを 50 個分測定した。
- (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・線維径を算出した。

空隙率の算出方法

- (1) ペイントを起動した。
- (2) 色 2 にカラーボックスから黒を選択した。
- (3) ツールバーの自由選択で孔を囲み、切り取りした。これを写真中に存在する全ての孔に対して行った。
- (4) 画像を保存し、Adobe Photoshop 7.0 を起動した。
- (5) [ファイル]→[開く]から加工した画像を選択した。
- (6) [イメージ]→[色調補正]→[2 階調化]を選択し、2 階調化する境界のしきい値を 1 にした。
- (7) [イメージ]→[ヒストグラム]を選択し、黒のピクセル比率を読み取った。

・ エラスチンのアミノ酸配列¹⁶⁾

— 〈ブタエラスチンのアミノ酸配列〉 —				
GGVPGAVPGG	VPGGVFFPGA	GLGGLG(←		40
6×P、22×G、18×A、4×V、7×L、1×Y、2×F、1×D、1×K が含まれる				80
→)KA	AKAGAGLGGV	GGVGGLGVST	GAVVPQLGAG	120
PGAGAKAPGK	VPGVGLPGVY	PGTVLPGTGA	RFPGVGVLPG	160
VPTGTGVKAP	GGGGAFAGIA	GVGPFGGQQP	GVPLGYPIKA	200
PGKLPYGFPG	GVAGAAGKAG	YPTGTGVGTE	AAAAAAAAKA	240
AAKYGAPGAG	VLPGVGVGGV	GVPGGAGAIV	GIGGIAGAGA	280
VAAAVAAAAKA	AKYGAAGGLV	PGAPGFGPGV	GVPGVGVPGV	320
GVPGVGVPGV	SVPGVGVPGV	GVPGVGVPGV	GVPGVGVPGV	360
GVPGAVXPAA	AKAAAAKAAK	YGARGGVGVG	GIPTFGVGAG	400
GFPGFVGVG	GVPGAALSPA	GAVPGPLAAG	GAAAAAKAAK	440
LGAAGAGALG	GLVVGAEGAV	PGVPGAGAVP	GVGAPAAAAA	480
KAAAAAAQFG	LGP GIGVAPG	VG VAPGVGVA	PGVGVAPGVG	520
VAPGIGIGPG	GVIGAGAPAA	AKSAKAAKA	EFEAAAAGLPA	560
GVPGFVGAG	VPGFVGAGV	PGFGAGAVVG	PLAAAKAAKY	600
GAAG'ALGGVG	DLGGAGIPGG	VAGVGPAAKA	AKAAQFGVG	640
GVGGLGVGGL	GAVPGAGAFG	GVAPAAKAA	K	

・ フィブリリン-1 のアミノ酸組成

MRRGRLLLEIALGFTVLLASYTSHGADANLEAGNVKETRASRAKRRGGGGH
 DALKGPNVCGSRYNAYCCPGWKTLPGGNQCIVPICRHSCGDGFCSRPNMC
 TPCSGQIAPSCGSRSIQHCNIRCMNGGSCSDDHCLCQKGYIGTHCGQPVC
 ESGCLNGGRCVAPNRCACYGFTGPQCERDYRTGPCFTVISNQMCQGQLS
 GIVCTKQLCCATVGRAWGHPCEMCPAQPHPCRRGFIPNIRTGACQDVDEC
 QAIPGLCQGGNCINTVGSFECKCPAGHKLNEVSQKCEDIDECSTIPGICE
 GGECTNTVSSYFCKCPPGFYTSPDGTRCIDVRPGYCYTALTNGRCSNQLP
 QSITKMQCCCDAGRCWSPGVTVAPEMCPIRATEDFNKLCSVPMVIPGRPE
 YPPPPLGPIPPVLPVPPGFPPGPQIPVPRPPVEYLYPSREPPRVLPVNVT
 DYCQLVRYLCQNGRCIPTPGSYRCECNKGFQLDLRGECIDVDECEKNPCA
 GGECINNQGSYTCQCRAGYQSTLTRTECRDIDECLQNGRICNNGRCINTD
 GSFHCVCNAGFHVTRDGKNCEDMDECSIRNMCLNGMCINEDGSFKCICKP
 GFQLASDGRYCKDINECETPGICMNGRCVNTDGSYRCECFPLAVGLDGR
 VCVDTHMRSTCYGGYKRGQCIKPLFGAVTKSECCASTEYAFGEPCQPCP
 AQNSAEYQALCSSGPGMTSAGSDINECALDPDICPNGICENLRGTYKCIC
 NSGYEVDSTGKNCVDINECVLNSLLCDNGQCRNTPGSFVCTCPKGFIIKP
 DLKTCEDIDECESPCINGVCKNSPGSFICECSSESTLDPTKTICITIK
 GTCWQTVIDGRCEININGATLKSQCCSSLGAAWGSPCTLCQVDPICGKGY
 SRIKGTQCEDIDECEVFPGVCKNGLCVNTRGSFKCQCPSGMTLDATGRIC
 LDIRLETCLFRLYEDEECTLPIAGRHRMDACCCSVGAAWGTEECEECPMRN
 TPEYEELCPRGPGFATKEITNGKPFKDKINECKMIPSLCTHKGKCRNTIGS
 FKCRCDSGFALDSEERNCTDIDECRISPDLCGRGQCVNTPGDFECKCDEG
 YESGFMMMKNCMDIDECQRDPLLCRGGVCHNTEGSYRCECPPGHQLSPNI
 SACIDINECELSAHLCPNGRCVNLIKGYQCACNPGYHSTPDRLFCVDIDE
 CSIMNGGCETFTCTNSEGSYECSCQPGFALMPDQRSCDIDECEDNPNICD
 GGQCTNIPGEYRCLCYDGFMASEDMKTCVDVNECDLNPNICLSGTCENTK
 GSFICHCDMGYSKKGKTGCTDINECEIGAHNCGKHAVCTNTAGSFKCSC
 SPGWIGDGIKCTDLDECSNGTHMCSQHADCKNTMGSYRCLCKEGYTGDDF
 TCTDLDECSNENLNLGNGQCLNAPGGYRCECDMGFVPSADGKACEDIDEC
 SLPNICVFGTCHNLPGLFRCECEIGYELDRSGGNCTDVNECLDPTTCISG
 NCVNTPGSYICDCPPDFELNPTRVGCVDTRSGNCYLDIRPRGDNGDTACS
 NEIGVGVSASCCCSLGKAWGTPCEMCPAVNTSEYKILCPGGEGFRPNPI
 TVILEDIDECQELPGLCQGGKCINTFGSFQCRCPTGYLNLNEDTRVCDDVN
 ECETPGICGPGTCYNTVGNYTCICPPDYMQVNGGNNCMDMRRSLCYRNY

ADNQTCDGELLFNMTKKMCCCSYNIGRAWNKPCEQCPISTDEFATLCGS
QRPGFVIDIYTGLPVDIDECREIPGVCENGVCINMVGSRCECPVGFFYN
DKLLVCEDIDECQNGPVCQRNAECINTAGSYRCDCKPGYRFTSTGQCNDR
NECQEIPNICSHGQCIDTVGSFYCLCHTGFKTNDDQTMCLDINECERDAC
GNGTCRNTIGSFNCRNHFILSHNNDCIDVDECASGNGNLCRNGQCINT
VGSFQCQCNEGYESVAPDGRTCVDINECLLEPRKCAPGTCQNLDGSYRCIC
PPGYSLQNEKCEDIDECVEEPEICALGTCSNTEGSFKCLCPEGFSLSSSG
RRCQDLRMSYCYAKFEGGKCSSPKSRNHSKQECCALKGEGWGDPCELCP
TEPDEAFRQICPYGSGIIVGPDDSAVDMDECKEPDVCKHGCINTDGSYR
CECPFGYTLAGNECVDTDECSVGNPCGNGTCKNVIGGFECTCEEGFEPGP
MMTCEDINECAQNPLLCAFRVCNTYGSYECKCPVGYVLREDRRMCKDEDE
CEEKGHDCTEKQMECKNLIGTYMCICGPGYQRRPDGEGCVDENECQTKPG
ICENGRCLNTRGSYTCECNDGFTASPNQDECLDNREGYCFTEVLQNMCI
GSSNRNPVTKSECCDGGRGWGPHEICPFQGTVAFFKKLCPHGRGFMNTG
ADIDECKVIHDVCRNGECVNDRGSYHCICKTGYPDITGTSCVDLNECNQ
APKPCNFICKNTEGSYQCSCPKEYILQEDGRSCKDLDECATKQHNCQFLC
VNTIGGFTCKCPPGFTQHHTSCIDNNECTSDINLCGSKGICQNTPGSFTC
ECQRGFSLDQTGSSCEDVDECEGNHRCQHGCQNIIGGYRCSCPQGYLQHY
QWNQCVDENECLSAHICGGASCHNTLGSYKCMCPAGFQYEQFSGGCQDIN
ECGSAQAPCSYGCSNTEGGYLCGCPPGYFRIGQGHCVSGMGMGRGNPEPP
VSGEMDDNSLSPEACYECKINGYPKRGRKRRSTNETDASNIEDQSETEAN
VSLASWDVEKTAIFAFNISHVSNKVRILELLPALTTLTNHNRYLIESGNE
DGFFKINQKEGISYLHFTKKKPVAGTYSLQISSTPLYKKKELNQLDKYD
KDYLSELGDLNLMKIQVLLH

・ フィブリリン-2 のアミノ酸分析

MGRRRRLCLQLYFLWLGCVVLWAQGTAGQPQPPPKPPRPQPPQVRS
 TAGSEGGFLAPEYREEGA AVASRVRRRGQQDVLRGPNVCGSRFHSYCCPG
 WKTLPGGNQCIVPICRNSCGDGFCSRPNMCTCSSGQISSTCGSKSIQQCS
 VRCMNGGTCA DDHCQCQKGYIGTYCGQPVCENG CQNGGRCIAQPCACVYG
 FTGPQCERDYRTGPCFTQVNNQMCQGQLTGIVCTKTLCCATTGRAWGHPC
 EMCPAQPPCRRGFIPNIRTGACQDVDECQAIPGICQGGNCINTVGSFEC
 RCPAGHKQSETTQKCEDIDECSIIPGICETGECSNTVGSYFCVCPRGYVT
 STDGSRCIDQRTGMCFSGLVNGRCAQELPGRMTKMQCCCEPGRCWGIGTI
 PEACPVRGSEEYRRLCMDGLPMGGIPGSAGSRPGGTGGNGFAPSGNGNGY
 GPGGTGFIPIPGGNGFSPGVGGAGVGAGGQGPIITGLTILNQTIDICKHH
 ANLCLNGRCIPTVSSYRCECNMGYKQDANGDCIDVDECTSNPCTNGDCVN
 TPGSY YCKCHAGFQRTPTKQACIDIDECIQNGVLCKNGRCVNSDGSFQCI
 CNAGFELTTD GKNCVDHDECTTTNMCLNGMCINEDGSFKCICKPGFVLAP
 NGRYCTDVDECQTPGICMNGHCINSEGSFRDCPPGLAVGMDGRVCVDTH
 MRSTCYGGIKKGVCVRPFGAVTKSECCCANPDYGFGEPCQPCPAKNSAE
 FHGLCSSGVGITVDGRDINECALDPDICANGICENLRGSYRCNCNSGYEP
 DASGRNCIDIDECLVNRLLCDNGLCRNTPGSYSCTCPPGYVFRTE TETCE
 DINECESNPCVNGACRNNLGSFNCECSPGSKLSSTGLICIDSLKGTCWLN
 IQDSRCEVNINGATLKSECCATLGAAWGSPCERCELDTACPRGLARIKGV
 TCEDVNECEVFPGVCPNGRCVNSKGSFHCCEPGLTLDGTGRVCLDIRME
 QCYLKWDEDECIHPVPGKFRMDACCCAVGA AWGTECEEC PKPGTK EYETL
 CPRGAGFANRGDVL TGRPFYKDINECKAFPGMCTY GKCRNTIGSFKCRCN
 SGFALDMEERNCTDIDECRISPDLCGSGICVNTPGSFECECFEGYESGFM
 MMKNCMDIDGCERNPLL CRGGTCVNTEGSFQCD CPLGHELSPSREDCVDI
 NECSLSDNLCRNGKCVNMIGTYQCSCNPGYQATPDRQGCTDIDECMIMNG
 GCDTQCTNSEGSYECSCSEGYALMPDGRSCADIDECE NNPDICDGGQCTN
 IPGEYRCLCYDGFMA SMDMKT CIDVNECDLNSNICMFGECENTKGSFICH
 CQLGYSVKKGTTGCTDVDECEIGA HNCMDMHASCLNIPGSFKCSCREGWIG
 NGIKCIDLDECSNGTHQCSINAQCVNTPGSYRCACSEGFTGDGFTCSDVD
 ECAENINLCENGQCLNVP GAYRCECEMGFTPASDSRSCQDIDECSFQNIC
 VSGTCNNLPGMFHCICDDGYELDR TGGNCTDIDECADPINC VNGLCVNTP
 GRYECNCPPDFQLNPTGVGCVDNRVGN CYLKFGPRGDGSLSCNTEIGVG
 SRSSCCCSLGKAWGNPCETCPPVNSTEYYTLCPGGEGFRPNPITIILEDI
 DECQELPGLCQGGNCINTFGSFQCECPQGY YLSEDTRICEDIDE CFAHPG

VCGPGTCYNTLGNYTCICPPEYMQVNGGHNCMDMRKSFCYRSYNGTTCEN
ELPFNVTKRMCCCTYNVGKAGNKPCEPCPTPGTADFKTICGNIPGFTFDI
HTGKAVIDECKEIPGICANGVCINQIGSFRCCEPTGFSYNDLLLVCEDI
DECSNGDNLQQRNADCINSPGSYRCECAAGFKLSPNGACVDRNECLEIPN
VCSHGLCVDLQGSYQCICHNGFKASQDQTMCMDEVDECERHPCGNGTCKNT
VGSYNCLCYPGFELTHNNDCLDIDECSSFFGQVCRNGRCFNEIGSFKCLC
NEGYELTPDGKNCIDTNECVALPGSCSPGTCQNLEGSFRCICPPGYEVKS
ENCIDINECEDPNICLFGSCTNTPGGFQCLCPPGFVLSDNRRCFDTRQ
SFCFTNFENGKCSVPKAFNTTKAKCCCSKMPGEGWGDPCELCPKDDEVAF
QDLCOPYGHGTVP SLHDTREDVNECLESPGICSNGQCINTDGSFRCECPMG
YNLDYTGVRVCDTDECSIGNPCGNGTCTNVIGSFECNCNEGFEPGPMNC
EDINECAQNPLLALRCMNTFGSYECTCPIGYALREDQKMCKDLDECAEG
LHDCESRGMCKNLIGTFMCICPPGMARRPDGEGCVDENECRTKPGICEN
GRCVNIIGSYRCECNEGFQSSSGTECLDNRQGLCFAEVLQTICQMASS
RNLVTKSECCDGGRGWGHQCELCPGTAQYKKICPHGPGYTDDGRDID
ECKVMPNLCTNGQCINTMGSFRCFCKVGYYTDDISGTSCIDLDECSQSPKP
CNYICKNTEGSYQCSCPRGYVLQEDGKTCKDLDECQTKQHNCQFLCVNTL
GGFTCKCPPGFTQHHTACIDNNECGSQPLLCGGKGICQNTPGSFSECEQR
GFSLDATGLNCEDVDECDGNHRCQHGCQNILGGYRCGCPQGYIQHYQWNQ
CVDENECSNPACGSASCYNTLGSYKACPSGFSFDQFSSACHDVNECSS
SKNPCNYGCSNTEGGYLCGCPPGYRVGQGHCVSGMGFNKGQYLSLDEV
DEENALSPEACYECKINGYPKKDSRQKRSIHEPDPTAVEQISLESVDMDS
PVNMKFNLSHLGSKEHILELRPAIQPLNNHIRYVISQGNDDSVFRIHQRN
GLSYLHTAKKKLMPGTYTLEITSIPLYKKKELKKLEESNEDDYLLGELGE
ALRMRLQIQLY