

2009 06015 B

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

マイクロ・ナノテクノロジーを用いた細胞組織構築のための培養皿の開発

平成20年度～21年度 総合研究報告書

研究代表者 福田 淳二

平成22(2010)年 5月

## 目 次

I. 総合研究報告	
マイクロ・ナノテクノロジーを用いた 細胞組織構築のための培養皿の開発 福田 淳二	----- 1
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 36
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 37

厚生労働科学研究費補助金（再生医療実用化研究事業）

（総合）研究報告書

マイクロ・ナノテクノロジーを用いた細胞組織構築のための培養皿の開発

研究代表者 福田 淳二 筑波大学大学院 数理物質科学研究科

#### 研究要旨

本研究では、電気化学的原理に基づき培養皿から細胞を素早く脱離する技術を確立した。この細胞脱離の原理は、金電極表面に結合させた、両末端にシステインを有するオリゴペプチドが、電気化学的に還元脱離する反応に伴って、接着細胞がペプチドとともに脱離するものである。この独自技術を基盤として、細胞シートや微小血管構造を有する細胞組織を構築するとともに、この技術が再生医療用の培養器具として実用化できる有望なシーズであることを示した。

研究分担者氏名・所属研究機関名及び所属研究機関における職名

崎山 亮一・東京女子医科大 助教

#### A. 研究目的

近年、日本発のアプローチである細胞シート工学を利用した再生医療が注目されており、臨床試験を含めた精力的な研究が進められている。現在の細胞シート工学には、温度応答性ポリマーを利用した培養皿が用いられているが、このアプローチの競争力を保ち我が国発の独自性を担保していくには、根幹となる細胞脱離技術について安全性・脱離時間などの観点から他の技術シーズも発掘しておく必要があると思われる。

一般に細胞回収にはタンパク質分解酵素を用いるが、この方法では細胞同士の結合も同時に切断されることから、構築した組

織を回収し、再生医療へと応用することはできない。現状の温度応答性ポリマーを修飾した培養皿においても、培養期間を通して温度調整に気を配る必要がある点や、アクリルアミドモノマーの安全性の懸念、細胞脱離に30分以上の時間を要する点などが課題として挙げられる。そこで本研究では、電気化学的原理に基づき、電位印加のみで培養表面から素早く細胞を脱離する独自技術を提案する。ここで電気化学的原理とは、金-チオール結合によって培養皿表面に自発的に結合させたオリゴペプチドが、負電位の印加により還元され脱離する現象のことである。すなわち金蒸着培養皿上で、ペプチドを介して細胞シートを形成・高度化し、ペプチドの還元脱離とともに回収する。ペプチドには、細胞外マトリクスに存在す

る細胞接着アミノ酸配列を組み込み細胞の足場を確保する。さらにその末端にはシステインを配置することで、システインの持つチオール基を金との結合に利用する。ペプチドは分解されてもアミノ酸が生じるのみであり、将来の臨床応用においても高い安全性が期待できる。

これまでに、電気化学的な原理に基づく細胞脱離技術の報告はなく、また本技術は温度応答性ポリマーのように特殊な電子線重合装置や技術を必要とせず、培地交換などの際に温度管理の必要性がないことから、安全性や操作性、さらに素早い細胞脱離が可能な優れた独創的技術となりうる。

また、回収した細胞シートを多層積層化して、生体外で生体類似構造を形成させるためには、実用的なサイズのシート回収が求められる。サイズが大きくなれば、細胞シート全体への均一な電位印加が細胞層の電気抵抗により妨げられることや、細胞へ栄養が充分供給されないことが予想される。そこで、培養皿表面にナノ孔を有する多孔質メンブレンを用いることによって、厚みのある細胞シートの形成とともに細胞シートのサイズに依らない脱離技術を目指す。また本研究では、この技術を金ワイヤに応用して血管構造を有する細胞組織を構築する。以上により、本技術が再生医療の実用化に向けた有望な技術シーズであることを示すとともに、再生医療用の培養器具としての実用化の可能性を示した。

## **B. 研究方法**

### **B1. 電気化学細胞脱離挙動の評価**

RGDペプチドの脱離に必要な電位を測定するとともに、RGDペプチドの脱離に伴い細胞を脱着させることが可能かどうか検討した。

### **B1.1 実験装置と試薬・材料**

#### **【装置】**

- ・電気化学測定装置：AUTOLAB EN 55022 (Eco Chemie 製)
- ・スパッタ装置 (CFS-4ES, 芝浦メカトロニクス製)
- ・ダイシングソー (A-WD-10A, 東京精密製)
- ・ポテンショスタット/ガルバノスタット (HA-151, 北斗電工製)
- ・位相差顕微鏡 (蛍光顕微鏡) (OLYMPUS 製)
- ・クリーンベンチ (三洋電機製)
- ・遠心分離機 (三洋電機製)
- ・インキュベータ (三洋電機製)
- ・超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE製)

#### **【試薬・材料】**

- ・パイレックスガラス基板 (No.7740 直径 3inch 厚さ500 μm Corning製)
- ・アンモニア水 (和光純薬工業製)
- ・過酸化水素水 (和光純薬工業製)
- ・塩化カルシウム (和光純薬工業製)
- ・塩化マグネシウム・六水和物 (和光純薬工業製)
- ・HEPES (和光純薬工業製)
- ・炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・水酸化ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化カリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化水素 (和光純薬工業製)
- ・エタノール (関東化学製)
- ・血管内皮細胞用増殖培地 EBM-2・添加因子セット (Table 1、三光純薬製)
- ・リン酸緩衝生理食塩水：Phosphate Buffered Saline：PBS (GIBCO製)
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC (理研 Cell bank)
- ・Cell Matrix Type I-A (新田ゼラチン製)

Table 1 EBM-2・添加因子

試薬	培地組成
Heparin	0.5 ml
Hydrocortisone	0.2 ml
アスコルビン酸	0.5 ml
hEGF	0.5 ml
FBS	10 ml
VEGF	0.5 ml
hFGF-B	2 ml
R3-IGF-1	0.5 ml
GA-1000	0.5 ml
ゲンタマイシン	50 mg/ml
アンホテリシン	50 µg/ml

- ・ Ham-F12 培地 (Powder, GIBCO製)
- ・ RGD ペプチド (配列 : CCRRGDWLC) (SIGMA製)
- ・ 培養用ディッシュ(Φ10 cm, 6 cm, 3.5 cm) (TPP製)

## B1.2 実験方法

### B1.2.1 RGDペプチド修飾—金チップ作製の作製手順

#### (1) 洗浄

ガラス基板と25%アンモニア水 : 30%過酸化水素水 : 純水 = 1 : 1 : 4の沸騰水溶液に5分間浸漬させ、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

#### (2) Au/Cr層のスパッタリング

スパッタリング装置を用い、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。

※基板に細胞を播種した場合に位相差顕微鏡で細胞を観察できるように、スパッタリング時間を短くし、金膜を薄く形成するよう工夫した。

#### (3) ダイシング

Au/Cr層をスパッタしたガラス基板をダイシングソーにてダイシングした。チップサイズは、縦15 mm × 横 10 mmとした。

#### (4) RGDペプチドの修飾 (Fig. 1)

純水を用いて1.0 mMに希釈したRGDペプチド溶液に、予めアセトンで洗浄した金チップをそれぞれ一晩浸漬させた後、純水で洗浄した。

更に細胞を播種する場合は、クリーンベンチ内で70%エタノール内に5分間浸漬を二回行い、滅菌した純水でよくすすぎ、使用するまで純水中に保存した。

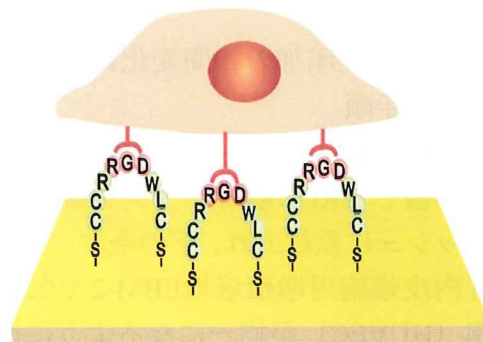


Fig. 1 RGD ペプチド接着細胞

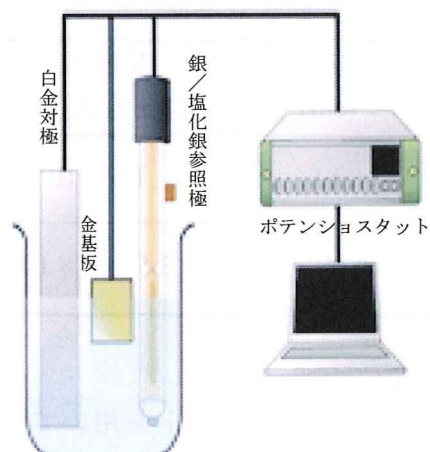


Fig. 2 三電極系および電気化学測定装置

### B1.2.2 サイクリックボルタンメトリ - (CV) によるRGDペプチド還元脱離電位測定方法

電気化学測定装置AUTOLABに、作製したRGDペプチド修飾チップを作用極に、銀/塩化銀電極（内部溶液：飽和KCl）を参照極に、白金板を対極に接続して、三電極系で測定した（Fig. 2）。電解質溶液には、溶存酸素を除去するために15分間窒素バブリングをした0.5MのKOHを用い、下記の条件で電気化学測定を行った。

開始電圧・・・ -0.3 V  
 最大掃引電圧・・・ -0.3 V  
 最小掃引電圧・・・ -1.0 V  
 掃引速度・・・ 20 mV/sec

### B1.2.3 電位印加の時間変化に対する細胞脱離評価手順

#### (1) 細胞播種

作製したRGD修飾チップを細胞培養用ディッシュに数枚入れ、下の条件に揃えて、血管内皮細胞用増殖培地EBM-2で血管内皮細胞（HUVEC）が均一になるように播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub>-Airのもとで一晩インキュベーションした。

Table 2 細胞培養条件

ディッシュ直径 (cm)	播種密度 (cells/dish)	培地量 (ml)
3.5	$1.5 \times 10^5$	2
6	$2.5 \sim 3.0 \times 10^5$	6

#### (2) 電位印加

ポテンシostatを用いて、細胞が接着したチップを作用極に、銀/塩化銀電極（内部溶液：飽和KCl）を参照極に、白金板を対極に接続し、支持電解液としてPBSにカルシ

ウムイオンとマグネシウムイオンを溶かした溶液（PBS+）をビーカーに入れ、三電極を構成した（Fig. 3）。この状態で、-1.0 Vを印加し、印加時間をストップウォッチで計りながら行った。印加時間は最大7分間とし、その間に細胞の様子を観察するとともに細胞数をカウントした。

#### (3) 位相差顕微鏡で画像撮影

電位印加時間0, 1, 2, 3, 5, 7分に対して、その都度チップを取り出し、PBS+で満たしたφ3.5 cmディッシュに浸した。そして、各チップにおいてFig. 3のように計数範囲を三箇所（各面積2.3 mm<sup>2</sup>）決め、位相差顕微鏡で事前にチップに付けた印（キズ）を目印に、できる限り同じ箇所を撮影した。

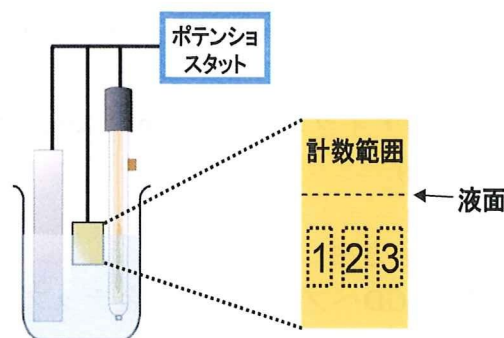


Fig. 3 三電極系とチップ計数範囲

#### (4) 細胞計数

撮影した画像をプリントアウトし、面積2.3 mm<sup>2</sup>の範囲で細胞数を計測した。接着細胞は伸展細胞のみとし、電位により完全に丸まった細胞は剥がれた細胞としてカウントした。

#### (5) 細胞脱離の時間変化

各チップの印加時間毎に計数した三箇所の合計を出し、印加時間0 minを基準の100%として、脱離細胞割合を導出した。これを3チップ間で平均して、縦軸：細胞脱着割

合 (%)、横軸：印加時間 (min) のグラフにプロットした。また各印加時間において、3チップ間の脱離細胞割合の標準偏差により、偏差を計算し、再現性を考慮して結果を表示した。

#### (6) ネガティブコントロール

ネガティブコントロールとして、RGDペプチドを修飾せず、-1.0 Vの電位を印加した場合、RGDペプチドを修飾し、金-チオール結合の脱離電位に満たない-0.5 Vの電位を印加した場合の二条件に対して、上記(1)～(5)の同様の実験を行い、比較した。

### B1.2.4 コラーゲンゲル内での細胞脱離評価

#### (1) 細胞播種

作製したRGD修飾チップを細胞培養用ディッシュに数枚入れ、Table 2の条件に揃えて、血管内皮細胞用増殖培地EBM-2で細胞(HUVEC)が均一になるように播種し、インキュベータ内で37°C、5%CO<sub>2</sub>-Airのもとで、80%コンフルエントになるように一晩培養した。

#### (2) 銀/塩化銀線作製

コラーゲンゲル内で正確に電位印加するために、二電極系の参照極となる銀/塩化銀線を作製した。

- 1) 試薬調製・・・1 M KCl溶液を作り、HClを加え、pH 2.2にした。
- 2) 銀線をエメリーペーパーなどで研磨し、適当な長さに切断した。
- 3) ガルバノスタットに三電極を接続し、ビーカー内の上記1)の調製試薬に浸した。ただし、作用極には銀線、参照極には銀/塩化銀電極(内部溶液：飽和KCl)、対極には白金板を接続した。
- 4) ガルバノスタットを用いて、電流値

0.5~0.6 mAを5分間流し、銀/塩化銀線を作製した。

#### (3) コラーゲンゲル調製

以下のA、B、Cの溶液を用意し、氷中に冷却した。

A : 0.3% Cellmatrix Type I-A

B : 10倍濃度の濃縮培地(粉末のHam-F12培地をミリQ超純水に溶解し、濾過滅菌して使用した。)

C : 再構成用緩衝液(0.05N水酸化ナトリウム溶液100 mlに対し、炭酸水素ナトリウム2.2 g、HEPES 4.77 gを溶かし、濾過滅菌して使用した。)

そして、低温に保ったまま、A、B、C液を8 : 1 : 1の割合で混合した。ここで、まずA液とB液を均一になるようにゆっくりピペティングしながら全体が薄黄色になるまで攪拌する。つぎにC液を加え、同じくピペティングしながら、全体が均一のピンク色になるまで攪拌する。気泡の混入に注意する。

この混合液を、インキュベータで37°C、5%CO<sub>2</sub>-Airのもとで15分間置くと、ゲル化することを確認した。

#### (4) 細胞脱離評価

- 1) 細胞で覆われたチップ上に、コラーゲン混合液を滴下し、インキュベータ内でゲル化させた。この時、インキュベータ時間を15分と60分で実験を行った。
- 2) ポテンシオスタットの作用極をチップに、参照極(参照極+対極)を銀/塩化銀線に接続した。
- 3) 電位-1.0 Vを5分間印加した。
- 4) ピンセットでチップからゲルを剥がし、チップ上の細胞とゲルに転写された細胞を位相差顕微鏡で観察した。
- 5) コラーゲンゲルに転写された細胞を



FDA/EB染色により、生死評価した。まず、ゲルをφ3.5 cmディッシュ内で、PBS+を用いて洗浄をし、FDA/EB混合染色液に浸し、インキュベータ（37℃、5%CO<sub>2</sub>-Air）で10分間置いた。その後、FDA/EB染色液を捨て、PBS+で洗浄を三回行った。更に、PBS+にゲルを浸して、蛍光顕微鏡で観察し、生死評価を行った。

6) ネガティブコントロールとして、電位印加せずにゲルを剥がしたときの細胞の脱離数、生死染色を観察し、電位印加した場合と比較した。

## B2. 金ワイヤからコラーゲンゲルへの細胞転写技術の確立

RGDを修飾した金ワイヤに培養ディッシュ内で細胞を接着させ、電気化学的な還元脱離によって細胞をコラーゲンゲルへ転写する技術を確立した (Fig. 4)。

### B2.1 実験装置と試薬・材料

#### 【装置】

- ・スパッタ装置 (CFS-4ES, 芝浦メカトロニクス製)
- ・ダイシングソー (A-WD-10A, 東京精密製)
- ・ポテンショスタット/ガルバノスタット (HA-151, 北斗電工製)
- ・位相差顕微鏡 (蛍光顕微鏡) (OLYMPUS製)
- ・クリーンベンチ (三洋電機製)
- ・遠心分離機 (三洋電機製)
- ・インキュベータ (三洋電機製)
- ・超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE製)
- ・真空デシケータ (VR, アズワン製)
- ・真空ポンプ (DTC-21, ULVAC製)
- ・電子顕微鏡 ED-SEM (日本電子)
- ・シリンジポンプ (アズワン製)
- ・マイクロシリンジ (5 ml, テルモ製)

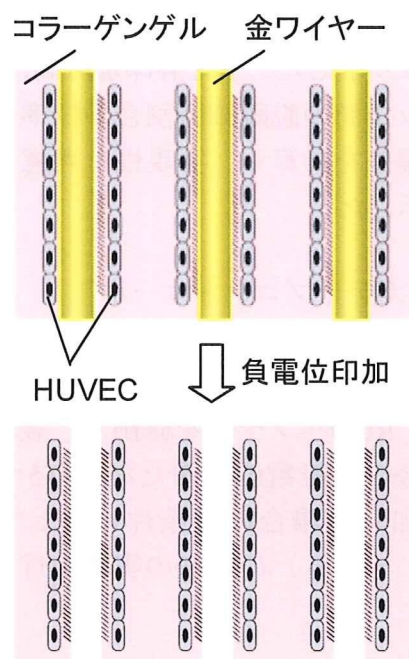


Fig. 4 金ワイヤからの細胞転写

#### 【試薬・材料】

- ・パイレックスガラス基板 (No. 740 直径3 inch 厚さ500 μm Corning製)
- ・ガラスキャピラリー (容量0.5, 3, 20 μl 長さ3.2 cm ドイツ製)
- ・アンモニア水 (和光純薬工業製)
- ・過酸化水素水 (和光純薬工業製)
- ・塩化カルシウム (和光純薬工業製)
- ・塩化マグネシウム・六水和物 (和光純薬工業製)
- ・HEPES (和光純薬工業製)
- ・炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・水酸化ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化カリウム (和光純薬工業製)
- ・塩化水素 (和光純薬工業製)
- ・エタノール (関東化学製)
- ・オスミウム水溶液 (0.1%, TAAB)
- ・t-ブチルアルコール (和光純薬工業製)
- ・Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit : DiI solutions (invitrogen製)



- ・ポリジメチルシロキサン前駆体(PDMS) (KE-1300T, 信越化学工業製)
- ・PDMS硬化剤 (CAT-1300, 信越化学工業製)
- ・Glutaraldehyde Solution (Fluka製)
- ・リン酸緩衝液: Phosphate Buffered Saline: PBS (GIBCO製)
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 HUVEC (理研 Cell bank)
- ・Cell Matrix Type I-A (新田ゼラチン製)
- ・Ham-F12 培地 (Powder, GIBCO製)
- ・RGD ペプチド (配列: CCRRGDWLC) (SIGMA製)
- ・培養用ディッシュ(Φ10 cm, 6 cm, 3.5 cm) (TPP製)
- ・血管内皮細胞用増殖培地 EBM-2・添加因子セット (三光純薬製)

## B2.2 実験方法

### B2.2.1 金ワイヤ作製と細胞培養の操作手順

#### (1) 洗浄

ガラスキャピラリー (容量0.5, 3 μl) をPDMS製の固定用台に20本前後差込み固定する。その状態で、25%アンモニア水:30%過酸化水素水:純水=1:1:4の沸騰水溶液に5分間浸漬させ、沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。

#### (2) Au/Cr層のスパッタリング

スパッタリング装置を用い、PDMS固定台に固定したままスパッタ層の中央部にポリイミドテープで固定し、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。※細胞の状態を位相差顕微鏡で観察できるように、スパッタリング時間は比較的短く設定している。

#### (3) RGDペプチドの修飾

純水を用いて1 mMに希釈したRGDペプチド溶液に、予めアセトンで洗浄した金ワイヤをそれぞれ一晩浸漬させた後、純水で洗浄した。

#### (4) 細胞の播種・培養

RGDペプチド修飾した金ワイヤをクリーンベンチ内で、70%エタノール (5分浸漬×2)、滅菌水の順に洗浄し、φ3.5 cmディッシュに1ディッシュ当たり4~5本並べて配置した (Fig. 5)。そしてHUVECを培地2 mlに細胞密度 $3.0 \times 10^5$  cells/dishを懸濁し播種した。それを数日間、インキュベータ内で37°C、5%CO<sub>2</sub>-Airのもとで培養した。

### B2.2.2 電子顕微鏡ED-SEMによる組織観察手順

HUVECが金ワイヤの周囲を覆っているのかを確認するために、培養日数3~4日間の金ワイヤ周囲の細胞を、電子顕微鏡 (ED-SEM)を用いて観察した。

#### (1) 組織の固定

##### ・前固定

2%パラホルムアルデヒド溶液と2.5%グルタルアルデヒド溶液/0.1 M buffer(pH7.4)を混合し、PBS+で洗浄した金ワイヤを室温で1時間浸漬した。

##### ・後固定

1%オスミウム水溶液 (OsO<sub>4</sub>) /0.1 M buffer(pH7.4)に金ワイヤを4°Cで1時間浸漬した。

#### (2)脱水処理

金ワイヤをエタノールに浸漬し、エタノール濃度30, 50, 70, 90%(on ice, 5min)の順に脱水処理した。最後に100%エタノール (室温, 5min×3) に置換した。

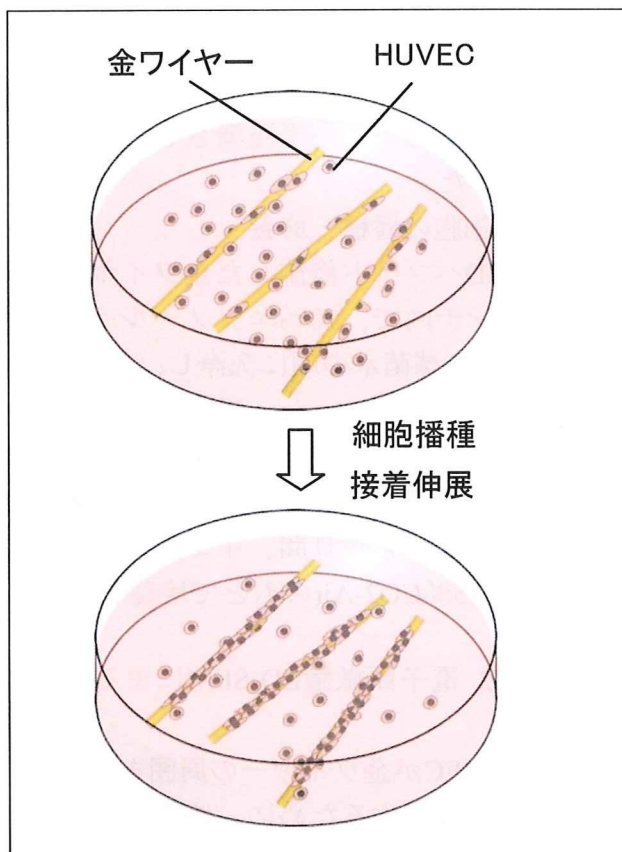


Fig. 5 金ワイヤーへの細胞播種

### (3)凍結乾燥

t-ブチルアルコール溶液に置換し、4℃で凍結させる。次に、真空デシケータを用いて、t-ブチルアルコール溶液を凍結させたまま乾燥させた。

### (4)電子顕微鏡による観察

電子顕微鏡で金ワイヤ周囲の細胞観察を行った。

### (5)分析

金ワイヤを細胞が覆うのに要する培養日数の確認や細胞同士の連結の様子を確認した。

### B2.2.3 金ワイヤからの細胞転写

血管代替の流路を作製するために、HUVECで覆われた金ワイヤとコラーゲンをを用いて、PDMS容器の中で血管様構造を

作製することを目指した。

### (1) 銀/塩化銀線作製

・コラーゲンゲル内で電位印加するために、三電極系の参照極となる銀・塩化銀線を作製した。

1) 試薬調製・・・1 M KClを作り、HClを加え、pH 2.2に調整した。

2) 銀線をエメリーペーパーなどで研磨し、適当な長さに切った。

3) ガルバノスタットに三電極を接続し、ビーカー内の試薬に浸した。

【作用極：銀線、参照極：銀/塩化銀電極（内部溶液：飽和KCl）、対極：白金板】

4) ガルバノスタットを用いて、電流値0.5~0.6 mAを5分間流し、銀・塩化銀線を作製した。

### (2)コラーゲンゲル調製

1) 準備：以下のA、B、Cの溶液を用意し、氷中で冷却する。

A：0.3% Cellmatrix Type I-A

B：10倍濃度の濃縮培地

・粉末のHam-F12 培地をミリQに溶かし、濾過滅菌して使用。

C：再構成用緩衝液

・0.05N水酸化ナトリウム溶液100 mlに対し、炭酸水素ナトリウム2.2 g、HEPES 4.77 gを溶かし、濾過滅菌して使用。

2) 調製：冷却しながら、A, B, C液を8 : 1 : 1の割合で混合する。

まず、A液とB液を均一になるようにゆっくりピペッティングしながら攪拌し、全体が薄黄色になったら、更にC液を加え、同じくピペッティングしながら、全体が均一のピンク色になるまで攪拌する。

3) 混合とゲル化：この混合液を、インキュベータで37℃、5%CO<sub>2</sub>-Airのもとで15分間

置くと、コラーゲンがゲル化する。

### (3) マイクロチャンバーの作製

HUVECで覆われた金ワイヤをコラーゲンゲル内で引き抜きその後の血管伸長を観察するための培養マイクロチャンバーを作製した。このチャンバーはPDMSとアクリル板の鋳型を用いて作製した。

- 1) PDMS前駆体に硬化剤を10 : 1の割合で加えて混合し、真空デシケータに入れ、真空ポンプで脱泡した。
- 2) 混合したものをアクリルの鋳型に流し込み、真空デシケータ内で空気が抜けるまでポンプによる脱泡を繰り返した。
- 3) アクリル鋳型に入った状態で、80°Cオーブンで25~30分間BAKEし、PDMSを硬化させた。
- 4) 作製したPDMS容器の中央の壁をカッターできれいに切り取った。
- 5) 更に両壁に、短くカットした容量20  $\mu$ lのガラスキャピラリーを差し込んで固定した。これは金ワイヤをPDMS容器に固定するために取り付けた。

この容器をクリーンベンチ内で70%エタノール、滅菌水の順に洗浄して乾燥させた。

### (4) 血管様構造の作製手順 (Fig. 6)

- 1) 培養中の金ワイヤを培養チャンバー両末端のガラスキャピラリーを通して固定した。
- 2) コラーゲン溶液を培養チャンバーへ流し込み、インキュベータ (37°C、5%CO<sub>2</sub>-Air) に15分間入れ、ゲル化させた。
- 3) ゲル化後、銀/塩化銀線および白金板をゲル内に差し込み、ポテンショスタットの作用極を金ワイヤに、参照極を銀/塩化銀線に、対極を白金板に接続し、電位-1.0 Vを5分間印加した。

4) 印加後、金ワイヤを真っ直ぐ引き抜き、位相差顕微鏡で血管様構造形成を確認した。

5) 培養チャンバーを $\phi$ 3.5 cmディッシュに入れ、作製した血管様構造構造に培地が行き届くように培地で満たし、ゲルが蒸発しないように培養チャンバー上面にカバーガラスでフタをし、数日間培養した。

### B2.2.4 Cell-Labeling染色による管腔評価

構築した管腔構造を評価し易くするために、予めCell-Labeling染色したHUVECを用いて、前節と同様に管腔構造を構築し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

・ 試薬 : Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit ; Dil solutions...Es\* (最大吸収波長): 549 nm、Em\* (最大蛍光発光波長) : 565 nm

- 1) 培地からサンプルを取り出し、余分な培地を慎重に吸い取る。
- 2) 培地1 mlに対し、Dil solutionを5  $\mu$ lを加えて攪拌し、染色液を準備する。
- 3) サンプルに染色液を滴下し、全体に行渡らせる。
- 4) 20分間インキュベート (5%CO<sub>2</sub>-Air、37°C) する。

※この染色最適時間は細胞によって異なり、HUVECは20分で染色されることを確認した。

- 5) 染色液を捨て、予め37°Cに温めておいた培地を加え、10分間インキュベートする。
- 6) この操作を三回繰り返し、洗浄する。
- 7) サンプルを培地または、PBSで満たし、蛍光顕微鏡で観察する。

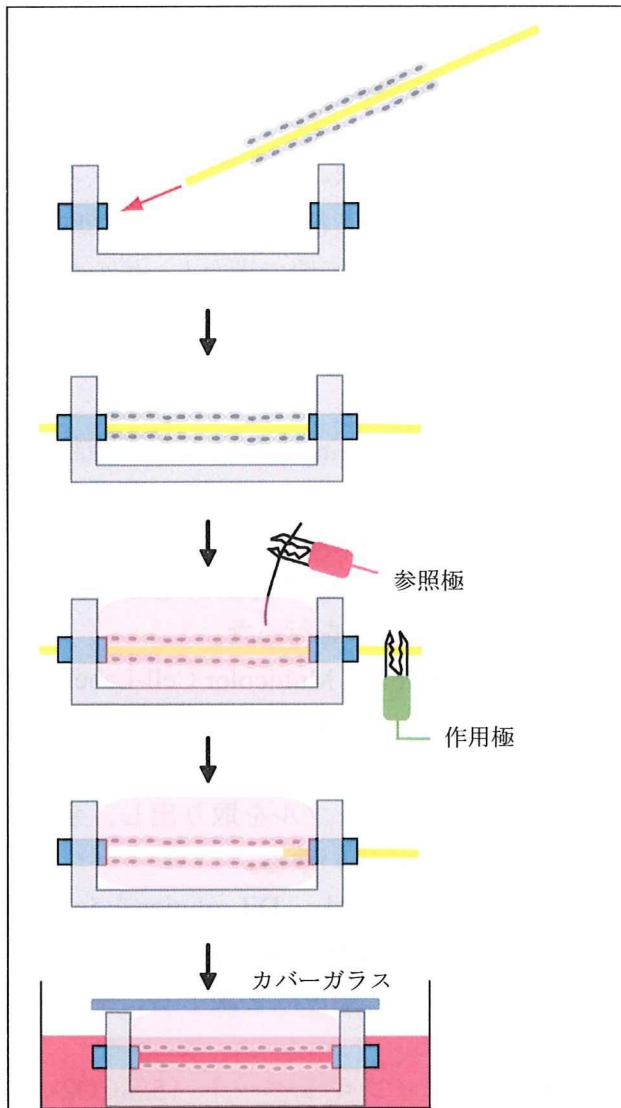


Fig. 6 マイクロチャンバー内におけるカラーゲンゲル内への血管様構造作製

### B2.2.5 送液培養による分岐流路の伸展

作製した血管用構造内に、血管新生促進因子 (VEGF) を含有した培地を送液することで管腔構造 (分岐流路) の伸展を促した。

#### <送液培養条件>

- 5 mL マイクロシリンジ使用 (シリコンチューブ接続)
- flow rate : 10  $\mu\text{L}/\text{min}$
- インキュベータ内 (37°C、5%CO<sub>2</sub>-Air)

で48h培養

- 8hおきにシリンジ交換 (培地補充)

#### <せん断応力>

作製した血管様構造にかかるせん断応力:  $\tau$  について条件を以下の公式に当てはめて計算する。

$$\tau = \mu \cdot 6Q / \pi \cdot r^3$$

$\tau$  : せん断応力 [mPa]

$\mu$  : 粘度 [mPa · s]

$Q$  : 流量 [ $\mu\text{L}/\text{s}$ ]

$r$  : 流路の内径 [mm]

※生体内の毛細血管に付加されるせん断応力は、1~5  $\text{dyn}/\text{cm}^2$  (100~500 MPa)

### B3 ナノ孔メンブラン上でのシングル細胞脱離

細胞シートを構築するためには、細胞を培養基板上で増殖させ、細胞同士が積層化した組織を構築する必要がある。しかしながら、通常のプラスチック培養ディッシュでは、細胞密度がコンフルエントに近い状態ですでに低酸素状態となっていることが分かっており、厚みのある細胞シートの形成には限界がある。そこで、本研究では基板表面にナノメートルの孔を有するメンブランを用い、酸素の供給を改善することでメンブラン上において厚みのある細胞シートを作製し、これを脱離回収して積層化することを目的とした。ここでは、細胞シートを電気化学的に脱離させる前段階として、まずシングル細胞のメンブラン上からの脱離を定量的に評価した。

#### B3.1 実験装置と試薬・材料

##### [試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4 HD(a high

pore density membrane), BD Falcon

- Cell Culture Insert, pore size 0.4, BD Falcon
- Multiwell 6 well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列 :  
-CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- マウス線維芽細胞 : 3T3 Swiss Albino  
(RCB1642), Riken Cell Bank
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液 : Phosphate Buffered Saline :  
PBS-, GIBCO

#### [装置]

- スパッタデポジション装置 : CFS-4ES-231,  
Shibaura Eletec.
- ポテンショスタット/ガルバノスタット :  
HA-151, Hokuto denko.
- Ag/AgCl 参照電極 : #012167, BAS Inc.
- 位相差顕微鏡 : IX-71, Olympus.
- クリーンベンチ, 三洋電機
- 遠心分離機, 三洋電機
- インキュベータ, 三洋電機
- 超純水製造装置 : Milli-Q Advantage A10,  
MILLIPORE

#### <実験手順>

- 1) Au/Cr層のスパッタ 細胞培養用のCell Culture Insert (Fig. 7) をスパッタリング装置のチャンバーに装着し、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCrを30分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。
- 2) オリゴペプチドの固定 0.5 mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成したCell Culture Insertのメンブレン全体を覆うように滴下し、蒸発を防ぐために4°Cの冷蔵庫で一晩静置させた後、純水で基板を洗浄した。

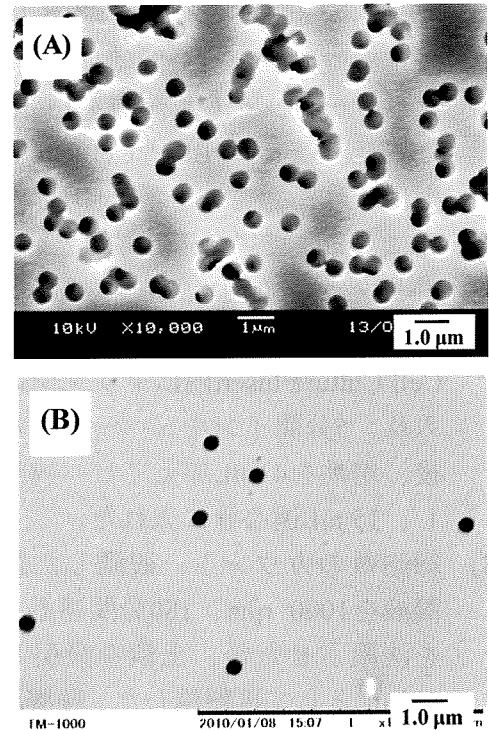


Fig. 7 ナノ孔を有するメンブレンの走査型電子顕微鏡写真。(A) 高密度ナノ孔タイプ、(B) 低密度ナノ孔タイプ

- 3) 基板の滅菌 オリゴペプチドを固定したCell Culture Insertを、クリーンベンチ内で70%エタノール→滅菌水の順に洗浄し滅菌し、専用の培養容器である6 wellマルチウェルプレートに入れた。
- 4) 細胞の播種 マウス線維芽細胞3T3を10%FBS添加培地に $5.0 \times 10^4$  cells/mLの密度で懸濁し、1ディッシュ当たり2 mL量、すなわち $1.0 \times 10^5$  cells/dishの密度で細胞を播種した。
- 5) 細胞の培養 播種した細胞をインキュベータ内で37°C、5%CO<sub>2</sub>-Airのもとで約12-18時間培養した。
- 6) 電位の印加 (Fig. 8) Cell Culture Insert内の培地をPBS-に交換した。細胞培養ディッシュを作用極、市販のAg/AgCl電極(内部電解液 : 飽和NaCl溶液)を参照極、白金板を対極とし、3電極系を形成し、



これらをポテンショスタットに接続して定電位-1.0 Vを1分間印加した後、軽くピペティングして溶液を15 mL遠心管に入れ、新しいPBS-をCell Culture Insert内に入れた。これを電位印加時間が6分間になるまで繰り返し続けた。

- 7) トリプシン処理 電位印加しても剥がれなかった細胞を全て回収するために、Cell Culture Insert内にトリプシンを1 mL入れ、5分間インキュベートした。その後、培地を4 mL加えてピペティングし、15 mL遠心管に入れた。
- 8) 細胞数のカウント 脱離した細胞の懸濁液を1000 rpm、180分間遠心し、細胞を沈殿させた後、上清を吸引して全量100 uLとして再懸濁した。懸濁液をヘモサイトメーターに入れ、位相差顕微鏡を用いてカウントした。

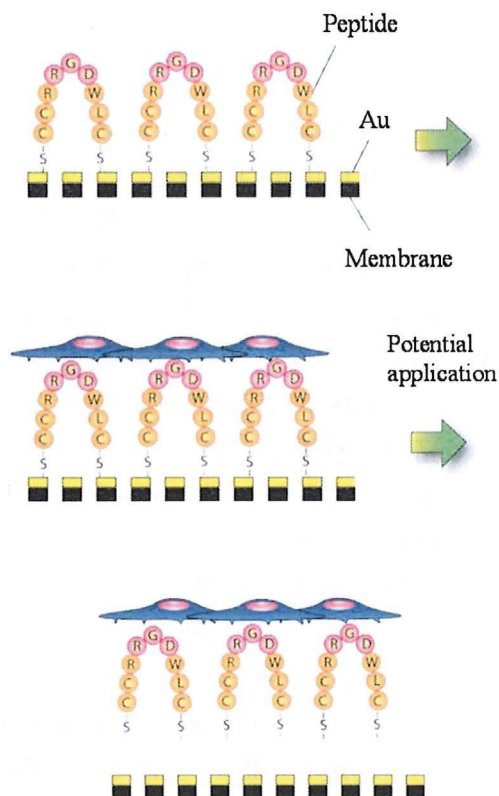


Fig. 8 電位印加による細胞脱離

#### B4. ナノ孔膜からの細胞シートの脱離および積層化

多孔質膜上において形成される細胞シートと、通常のガラス基板上で培養した細胞シートとを比較するとともに、上記にて確立した技術を用いることで、厚みのある細胞シートを形成させ、なおかつ回収・積層化する技術を開発した。

##### [試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4 HD(a high pore density membrane), BD Falcon
- Multiwell 6well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列: -CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- マウス線維芽細胞: 3T3 Swiss Albino (RCB1642), Riken Cell Bank

##### [装置]

- スパッタデポジション装置: CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ポテンショスタット/ガルバノスタット: HA-151, Hokuto denko.
- Ag/AgCl 参照電極: #012167, BAS Inc.
- 位相差顕微鏡: IX-71, Olympus.

##### <実験手順>

- 1) Au/Cr層のスパッタ スパッタリング装置を用い、出力100 W、アルゴン雰囲気0.3 PaにてCell Culture InsertにCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。その後引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。
- 2) オリゴペプチドの固定 0.5 mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成したCell Culture Insertの膜全体を覆うように滴下し、蒸発を防ぐために4°Cの冷蔵庫で一晩静置させた後、純水で基板を洗浄した。
- 3) 基板の滅菌 オリゴペプチドを固定し

たCell Culture Insertを、クリーンベンチ内で70%エタノール→滅菌水の順に洗浄し滅菌し、専用の培養容器である6wellマルチウェルプレートに入れた。

- 4) 細胞の播種 マウス線維芽細胞3T3を10%FBS添加培地に $5.0 \times 10^5$  cells / mlの密度で懸濁し、1ディッシュ当たり2 ml量、つまり $1.0 \times 10^6$  cells / dishの密度で細胞を播種した。

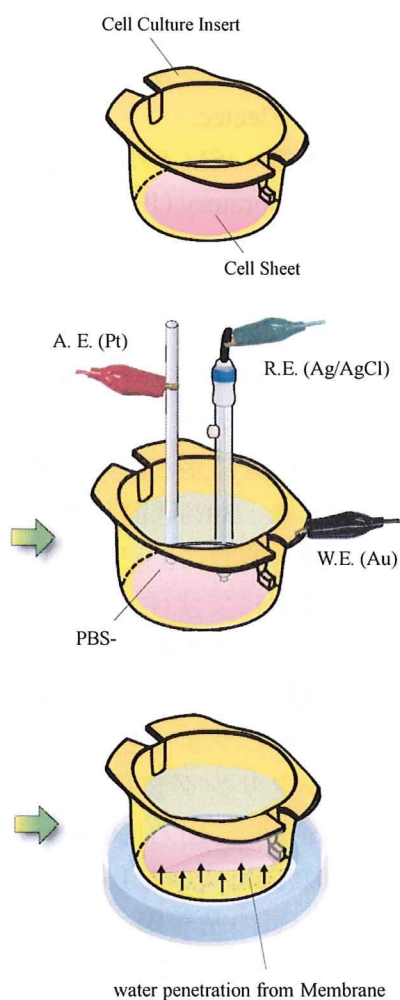


Fig. 9 細胞シートの多孔質メンブランからの脱離

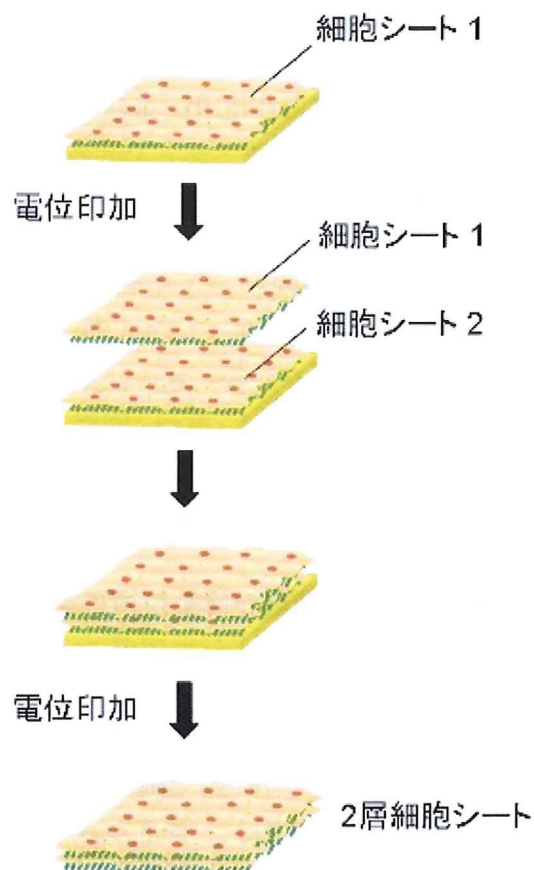


Fig. 10 細胞シートの積層化

- 5) 細胞の培養 播種した細胞をインキュベータ内で $37^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ -Airのもとで2週間培養した。
- 6) 電位の印加 Cell Culture Insert内の培地をPBS-に交換した。細胞培養ディッシュを作用極、市販のAg/AgCl電極(内部電解液：飽和NaCl溶液)を参照極、白金板を対極とし、3電極系を形成し、これらをポテンショスタットに接続して定電位 $-1.0\text{ V}$ を5分間印加した。
- 7) 細胞シートの回収 シリコンシートをメンブレンの直径に合うようにリング状にくり抜き、 $\phi 3\text{ cm}$ ディッシュに固定した。シリコンリングとディッシュによって形成されたくぼみに、あらかじめPBS-を満たしておき、その上からCell

Culture Insert押し込むことで、気孔からPBS-が供給されることで細胞シート浮き上がらせた(Fig. 9)。最後に、浮遊した細胞シートをピペットで回収した。

- 8) 細胞シートの積層化 回収した細胞シートをディッシュに移動させ、その上から新たな細胞シートを重ね、37°C, 5% CO<sub>2</sub>-Airの雰囲気下で5分間インキュベートした。その後、さらに新たな細胞シートをその上から重ね、同様にインキュベートさせることで、積層化した細胞シートを形成した。(Fig. 10)

### B5. 微小血管構造の構築技術の構築

ティッシュ・エンジニアリング分野における最も重要な課題の一つは如何に血管構造を張り巡らせた組織を構築するののかということである。本研究で確立した電気化学的な細胞脱離技術は、平面のみならず、微細な金ワイヤにも応用可能である。そこで、金ワイヤに接着させた血管内皮細胞をコラーゲンゲルの内腔に転写し、内表面が血管内皮細胞に覆われた微小流路構造を作製する技術を確立した。血管内皮細胞は、その後の還流培養において、自発的に管腔構造をコラーゲン側面に伸長し、血管ネットワークを形成した。

#### 【試薬】

- ・ガラスキャピラリー：φ600 μm×3.2 cm, Hirschmann Laborgeräte, Germany.
- ・オリゴペプチド (CCRRGDWLC)：Sigma Aldrich Japan.
- ・ヒト臍帯静脈血管内皮細胞：Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, CC-2517A), Riken cell bank.
- ・血管内皮細胞用増殖培地：Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2), Cambrex Bio Science.
- ・PDMS (Polydimethylsiloxane)：KE-1300T, ShinEtsu.

- ・PDMS硬化剤：CAT-1300, ShinEtsu.
- ・リン酸緩衝生理食塩水：Phosphate Buffered Saline (PBS), GIBCO.
- ・ウシ血清アルブミン：BSA, Sigma.
- ・パラホルムアルデヒド：4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution, Wako.
- ・グルタルアルデヒド：25% Glutaraldehyde Solution in water, Fluka Bio chemika.
- ・オスミウム酸：Osmium tetroxide EM, TAAB.
- ・t-ブチルアルコール：t-Butyl Alcohol, Wako.

#### 【装置】

- ・スパッタデポジション装置：CFS-4ES-231, Shibaura Electec.
- ・電子顕微鏡：JSM-5510SEM, Japan Electron Optics Laboratory (JEOL)

#### <実験手順>

##### 金ワイヤの準備

- 1) ガラスキャピラリー洗浄 30~50本のガラスキャピラリーをPDMSで作製した土台に垂直に差し込み、純水：25%アンモニア水：30%過酸化水素水=1：1：4の沸騰水溶液に5分間浸漬し、更に沸騰した純水にてすすぎを2回それぞれ5分間行い、自然乾燥させた。
- 2) Au/Cr層のスパッタ PDMSの土台にガラスキャピラリーを差し込んだ状態で、スパッタリング装置のチャンバー中央部に固定し、出力100 W、アルゴン雰囲気下0.3 PaにてCrを1分間スパッタした。CrはAu層の密着層である。引き続き、Auを同条件にて2分間スパッタした。
- 3) RGDペプチドの修飾 1mM RGDペプチド溶液にガラスキャピラリーを一晩(12~15h)浸漬させた後、純水で洗浄した。

### 細胞非接着培養ディッシュの準備

- 1) BSA (ウシ血清アルブミン) 0.6 gをPBS (リン酸緩衝生理食塩水) 20 mLに溶解するした。
- 2) 架橋剤EGDE (エチレングリコールジグリシジルエーテル) 652  $\mu$ L加えたる。
- 3) 24h室温で攪拌し、架橋反応させる。
- 4) 未反応のEGDEを除去するために、室温で2~3日透析する。
- 5) 透析後30 mLにメスアップする。
- 6) 50%グリセリンを284  $\mu$ L加える。
- 7) ろ過滅菌する。
- 8)  $\phi$ 35 mmディッシュに架橋アルブミンを500  $\mu$ L添加する。
- 9) 10~20分放置した後に、アルブミン溶液を除去する。
- 10) クリーンベンチ内 (無菌状態) で、一晚乾燥させる。

### 金ワイヤへの細胞接着

- 1) 金線の滅菌 RGDペプチドを修飾した金線をクリーンベンチ内で70%エタノール、滅菌水の順にそれぞれ5分間浸漬し、滅菌した。
- 2) 細胞の播種 金線を架橋アルブミンコートディッシュに5~10本入れ、EBM-2に $7.5 \times 10^4$  cells/mLの密度で懸濁したHUVECを1ディッシュ当たり2 mL量、つまり $1.5 \times 10^5$  cells/dishの密度で播種した。
- 3) 細胞の培養 播種した細胞をインキュベータ内で37°C、5% CO<sub>2</sub>-Airのもとで、金線周囲を完全に覆うまで、3~4日間培養した。

### 電子顕微鏡ED-SEMによる組織観察

HUVECが金ワイヤの周囲を覆っているのかを確認するために、培養日数3~4日間の金ワイヤ周囲の細胞を、電子顕微鏡

(ED-SEM)を用いて観察した。

- 1) 組織の固定
  - (ア)前固定: 2%パラホルムアルデヒド溶液と2.5%グルタルアルデヒド溶液 / 0.1 M buffer(pH7.4)を混合し、PBS+で洗浄した金ワイヤを室温で1時間浸漬した。
  - (イ)後固定: 1%オスミウム水溶液 (OsO<sub>4</sub>) / 0.1 M buffer(pH7.4)に金ワイヤを4°Cで1時間浸漬した。
- 2) 脱水処理 金ワイヤをエタノールに浸漬し、エタノール濃度30, 50, 70, 90%(on ice, 5min)の順に脱水処理した。最後に100%エタノール (室温, 5min $\times$ 3) に置換した。
- 3) 凍結乾燥 t-ブチルアルコール溶液に置換し、4°Cで凍結させる。次に、真空デシケータを用いて、t-ブチルアルコール溶液を凍結させたまま乾燥させた。
- 4) 電子顕微鏡による観察 電子顕微鏡で金ワイヤ周囲の細胞観察を行った。
- 5) 分析 金ワイヤを細胞が覆うのに要する培養日数の確認や細胞同士の連結の様子を確認した。

### 血管様構造の作製 (Fig. 11)

- 1) 培養チャンバーの作製 厚さ3 mmのアクリル板をレーザー加工機で切断し、接着剤 (アクリサンデー) を用いて、培養チャンバーを作製した (内側: 1 cm $\times$ 2 cm $\times$ 0.5 cm)。細胞に害を与えないように、80°Cオープンに数時間入れて、接着剤を完全に乾燥させた。さらに、純水に一晩漬けた後、70%エタノールで滅菌して使用した。 (Fig. 12上)



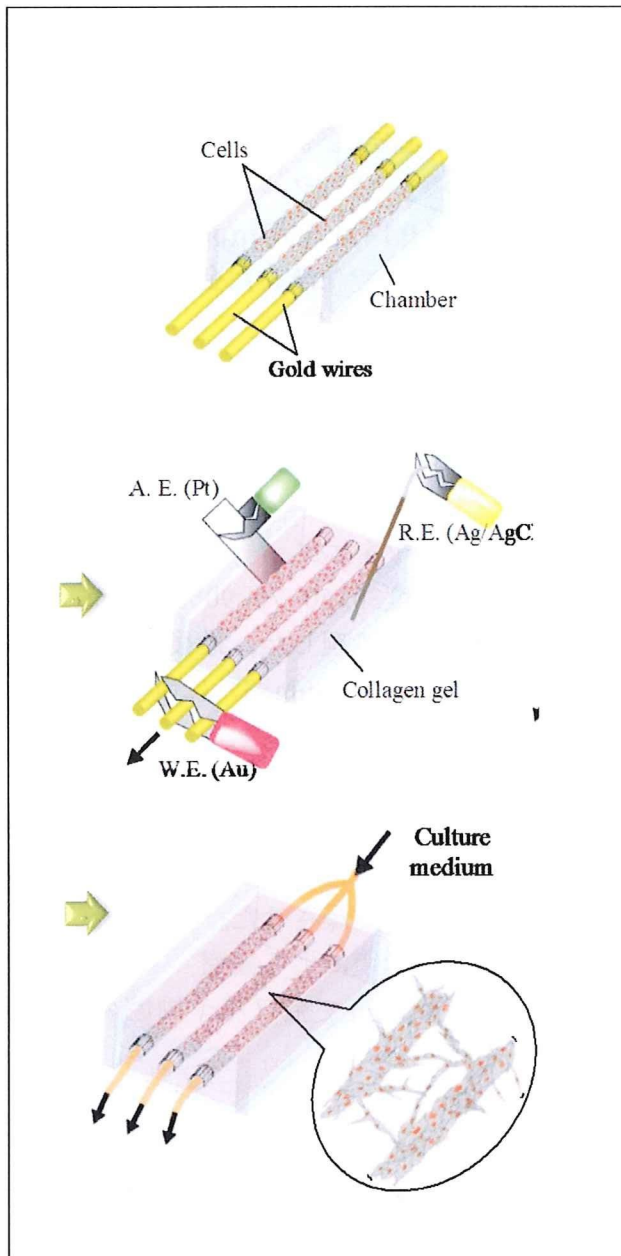


Fig. 11 微小血管構造の作製手順

- 2) 金線の固定 培養した金線をPBS溶液に一度漬けてから、表面の細胞を乾燥させないように、アクリルの培養チャンバーに3本固定した (Fig. 12下)。このとき、チャンバーの両側に開けた穴のサイズと金線の直径があまり変わらないので、細胞を傷つけないように注意しながら差し込んだ。

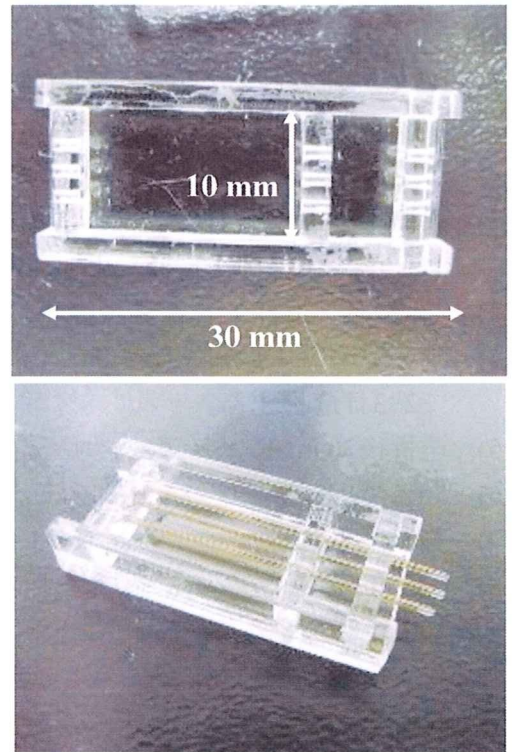


Fig. 12 血管構造形成用培養チャンバー

- 3) コラーゲン溶液のゲル化 氷上で調製したコラーゲンゲル前駆体溶液1 mLを培養チャンバーに流し込み、インキュベータ内で37℃、5% CO<sub>2</sub>-Airのもとで1~2時間静置し、ゲル化させた。
- 4) 電位の印加 金線を作用極、銀/塩化銀線を参照極、白金板を対極として、コラーゲンゲル内に差し込むことで三電極系を形成し、ポテンショスタットに接続した。そして、定電位-1.0 Vを5分間印加した。
- 5) 血管様構造の形成 電位を印加して金線と細胞の結合を切断した後に、PDMSチャンバーから金線を3本とも丁寧に真っ直ぐ引き抜くことで、コラーゲンゲル内に微小間隔で並列に配置した血管様構造を形成した。
- 6) 血管ネットワーク形成 作製した血管様構造をPMA含有培地中で培養し、管腔



構造を伸長させた。また、PMAを含んだ培地をシリンジポンプで送液しながら培養することで、管腔の形成を促進させた。そして、血管様構造同士が互いに連結するまで培養し、位相差顕微鏡で観察した。

#### Cell-Labeling染色による管腔評価

構築した管腔構造を評価し易くするために、予めCell-Labeling染色したHUVECを用いて、前節と同様に管腔構造を構築し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

・試薬：Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit ; Dil solutions・・・Es\* (最大吸収波長): 549 nm、Em\* (最大蛍光発光波長): 565 nm

- 1) 培地からサンプルを取り出し、余分な培地を慎重に吸い取った。
- 2) 培地1 mlに対し、Dil solutionを5 µlを加えて攪拌し、染色液を準備した。
- 3) サンプルに染色液を滴下し、全体に行渡らせた。
- 4) 20分間インキュベート (5%CO<sub>2</sub>-Air、37°C) した。この染色最適時間は細胞によって異なり、HUVECは20分で染色されることを確認した。
- 5) 染色液を捨て、予め37°Cに温めておいた培地を加え、10分間インキュベートした。
- 6) この操作を三回繰り返す、洗浄した。
- 7) サンプルを培地または、PBSで満たし、蛍光顕微鏡で観察した。

#### 送液培養による分岐流路の伸展

作製した血管用構造内に、血管新生促進因子 (VEGF) を含有した培地を送液することで管腔構造 (分岐流路) の伸展を促した。  
<送液培養条件>

・5 mLマイクロシリンジ使用 (シリコンチューブ接続)

- ・ flow rate : 10 µL/min
- ・ インキュベータ内 (37°C、5%CO<sub>2</sub>-Air) で 48h培養
- ・ 8hおきにシリンジ交換 (培地補充)

#### **B6 肝細胞スフェロイドの肝不全ラットへの移植**

すでに開発したスフェロイド培養皿上で形成させた細胞組織体が再生医療分野において有用であることを示すために、電位印加により肝細胞スフェロイドを一括して回収後、アンモニア代謝機能を評価するとともに、外科的に肝不全としたラットに移植してスフェロイドの生存状態を評価した。

- 1) スフェロイドをそのまま脱離させると互いに凝集し、巨大な細胞凝集体となり内部で酸素枯渇による壊死が生じる。そこで、脱離前にコラーゲングルで全体を包埋し、電位印加によりアレイ状態のスフェロイドを回収した。電位印加は、定電位-1.0 Vを5分間印加した。
- 2) コラーゲングルへ転写・回収したスフェロイドを12穴ディッシュの各ウェルに入れ、1 mMのアンモニアを添加した培地中で培養して、その代謝速度を評価した。
- 3) Wister ラットの腹部を正中切開し、肝臓の左葉および中葉根元の門脈枝を結紮した後、これらの葉を切除 (2/3部分肝切除) した。さらに、門脈を15分間虚血し、残存肝について広範性肝壊死を誘発した。
- 4) コラーゲングルに包埋・回収したスフェロイドを腹腔内の脾臓、肝臓、腸間膜付近へそれぞれ留置した後、腹部を縫合し、覚醒させた。移植24時間後、開腹し、移植したゲルを取り出し、染色により評価した。

## B7 電気化学細胞脱離を利用した心筋細胞シートの作製

心筋細胞シートは、拡張型心筋症などの重篤心不全に対する治療法として期待されており、また生体内埋め込み型マイクロデバイスのポンプ動力としても有望であると考えられている。そこで、電気化学的な細胞脱離技術が心筋細胞シートの構築に有用であることを示した。

### 【実験動物】

- ・妊娠19日 Wisterラット (オリエンタルバイオサービス関東)
- ・生後2日 Wisterラット (オリエンタルバイオサービス関東)

### 【装置・備品】

- ・恒温振動機 (アズワン製)
- ・電気化学測定装置: AUTOLAB EN 55022 (Eco Chemie 製)
- ・スパッタ装置 (CFS-4ES, 芝浦メカトロニクス製)
- ・ダイシングソー (A-WD-10A, 東京精密製)
- ・ポテンショスタット/ガルバノスタット (HA-151, 北斗電工製)
- ・位相差顕微鏡 (蛍光顕微鏡) (OLYMPUS 製)
- ・クリーンベンチ (三洋電機製)
- ・遠心分離機 (三洋電機製)
- ・インキュベータ (三洋電機製)
- ・超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE製)
- ・ラボ・オートクレーブ (三洋電機製)
- ・pHメーター (東亜DKK製)
- ・ホットプレート (AS ONE 製)
- ・デシケータ (サンブラテック製)
- ・0.22  $\mu$ mメンブレンフィルター (Corning製)
- ・細胞培養用ディッシュ ( $\Phi$  10 cm) (TPP製)
- ・Centrifuge tube (50ml) (TPP製)
- ・セルストレーナー-mesh 40  $\mu$ m (Falcon製)

- ・ホールオペクトグラス (池本理化工業製)
- ・フィブロネクチンコート細胞培養ディッシュ (6well plate) (Falcon製)
- ・銀/塩化銀参照極 (堀場製作所製)
- ・パイレックスガラス基板 (No.7740 直径 3inch 厚さ500  $\mu$ m Corning製)
- ・Lab-Tekチェンバースライド(ウェル 1) (Nalge Nunc International K.K. 製)
- ・マイクロカバーガラス (24×24mm, 松浪硝子工業製)
- ・真空デシケータ (VR, アズワン製)
- ・真空ポンプ (DTC-21, ULVAC製)

### 【試薬・材料】

- ・D-MEM/HamF12 500ml (GIBCO BPL製)
- ・コラゲナーゼ (和光純薬工業製)
- ・ITS-X (GIBCO 製)
- ・BSA 30% 溶液 (SIGMA製)
- ・トリパンブルー染色液 (GIBCO 製)
- ・ペニシリン・ストレプトマイシン液体 (GIBCO製)
- ・ウシ胎児血清FBS (GIBCO製)
- ・Hepes buffered minimum salt solution : MSS
- ・25%アンモニア水 (和光純薬工業製)
- ・30%過酸化水素水 (和光純薬工業製)
- ・エタノール (関東化学製)
- ・ジエチルエーテル (和光純薬工業製)
- ・Fibronectin (SIGMA製)
- ・10-Carboxy-1-decanethiol (同仁化学研究所製)
- ・HEPES (和光純薬工業製)
- ・炭酸水素ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・水酸化ナトリウム (和光純薬工業製)
- ・98%硫酸 (和光純薬工業製)
- ・Water Soluble Carbodiimide : WSC (同仁化学研究所製)
- ・N-Hydroxysuccinimide : NHS (和光純薬工業製)
- ・リン酸緩衝生理食塩水 : Phosphate Buffered