

厚生労働科学研究費補助金

再生医療実用化研究事業

工学的アプローチに基づく細胞シート培養器具の開発

平成23年度～24年度 総合研究報告書

研究代表者 福田 淳二

平成25（2013）年 5月

目 次

I. 総合研究報告

工学的アプローチに基づく

細胞シート培養器具の開発 ----- 1

福田 淳二

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 40

III. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 41

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

工学的アプローチに基づく細胞シート培養器具の開発
研究代表者 福田 淳二 横浜国立大学 大学院工学研究院

研究要旨

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している。特に、ナノ孔を有する膜上へこの技術を応用することで、厚みのある細胞シートを作成可能であることを示した。当該細胞脱離のメカニズムには、金-チオール結合によって培養表面に結合させたオリゴペプチドが電気化学的に還元され脱離する現象を利用して、本研究ではオリゴペプチドの新しい設計から研究を行った。そして、膜上から細胞を電気化学的に脱離可能であることを示した。細胞シート上でゲル化可能な生分解性ハイドロゲルにより脱離後の細胞シートの容易な取り扱いを可能とした。回収した厚みのある細胞シートをヌードマウスへ移植することで本手法の安全性を示した。また、さらに厚みのある細胞シートの作製に向けて、細胞シート内に血管内皮細胞のネットワーク構造を作製することが可能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

蛭沢克己・名古屋大医学部 病院助教
伊藤大知・東京大医学部 准教授

A. 研究目的

温度応答性ポリマーを用いた細胞シート工学が、日本発のアプローチとして注目されており、臨床試験を含めた精力的な研究が進められている。一方、本研究では、異なる原理に基づく細胞シート作製技術を提案する。すなわち、電気化学的原理に基づき、電位印加により培養表面から素早く細胞

を脱離する独自技術の提案である。特に、ナノ孔を有する膜上にこの技術を応用し、物質移動を促進した厚みのある細胞シートを素早く作製する。

この細胞脱離には、金-チオール結合によって培養表面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を利用する。特に従来技術との差別化を意識し、脱離時間の10分の1までの短縮や血管ネットワーク構造の導入、2液混合型化学修飾ハイドロゲルとの融合などを目指す。

研究期間内に、静電的な相互作用によって自己組織化し、表面上で密な層を形成するオリゴペプチドを設計する。そして、この表面に接着させた細胞を短時間で電気化学的に脱離させる。特に、酸素拡散の観点からメンブラン上で形成できる細胞シートの厚みを決定する。さらに、作製した細胞シートをゼラチンベースの生分解性ハイドロゲルを利用して転写し、脱離後の細胞シートの操作および移植部位への確実な固定に供する。また、動物実験において、本手法で作製した細胞シートが長期間にわたって生着すること、および本手法の安全性を示す。

将来的な目標は、本培養器具が様々な疾患の再生医療に広く応用可能であることを実証し、汎用的な研究用ツールとして普及させることである。

B. 研究方法

B1. ブリッジ型オリゴペプチドと両性イオンオリゴペプチドの評価

電気化学的な細胞脱離を行うためには、金薄膜表面を蜜に覆う分子層の形成が重要である。なぜなら、培地中のタンパクが直接金の表面に非特異吸着すると、電位を印加しても細胞は脱離しないためである。そこで本研究では、金表面に結合するとともに自己組織化して密な層を形成する両性イオンオリゴペプチドを設計し、疎な層しか形成しない従来のブリッジ型オリゴペプチドと比較した。その上で、分子動力学計算と実験とを組み合わせることで、最適な両性イオンオリゴペプチドの配列を検討した。

一般にタンパクの非特異吸着を抑制するためには、表面を親水性にすることが重要

であると考えられている。一方近年、両性イオン分子を修飾した表面が良好なタンパクの非接着表面として注目されている。例えば、ポリカルボキシベタイン修飾表面へのタンパクの吸着は、SPR測定で検出不可能な程に少ないことが明らかとなっている。こうした、非特異吸着を非常によく抑制する表面には、分子レベルで正負の電荷が中和されることが重要である。ここでは、正負の電荷を持ったアミノ酸を交互に配置したオリゴペプチドを設計した。この細胞非付着表面の上に、細胞接着配列を付与すれば、分子層の脱離によって素早い細胞脱離が得られる (Fig. 1)。

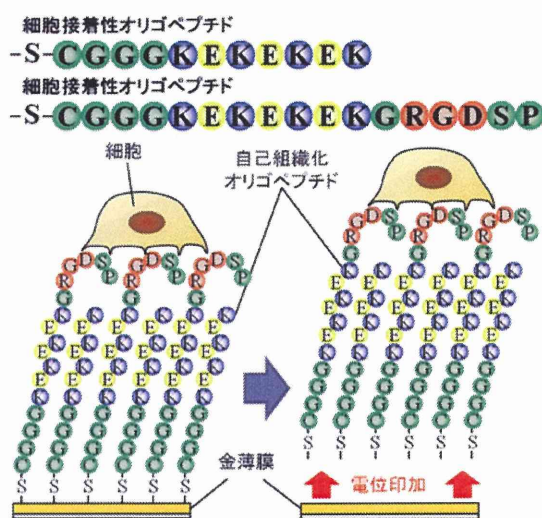


Fig. 1 自己組織化ペプチドの配列

B1.1 実験装置と試薬・材料

【装置】

- Quartz Crystal Microbalance (QCM), AFFINIX QN, Initium 社
- スパッタデポジション装置、CFS-4ES-231、Shibaura Eletec
- 位相差顕微鏡、IX-71、Olympus
- 電気化学測定装置: AUTOLAB EN 55022 (Eco Chemie 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)
- ・Ag/AgCl参照電極: #2080A, HORIBA

【試薬・材料】

- ・カバーガラス
- ・細胞非接着性オリゴペプチド、CGGGKEKEKEK (Sigma-Aldrich Japan)
- ・細胞接着性オリゴペプチド、CGGGKEKEKEKGRGDSP (Sigma-Aldrich Japan)
- ・ブリッジ型オリゴペプチド: CCRRGDWLC, (Sigma-Aldrich Japan)
- ・フィブロネクチン Sigma-Aldrich Japan
- ・フィブリノーゲン Sigma-Aldrich Japan
- ・Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), D5796, Sigma
- ・マウス線維芽細胞 Swiss 3T3(RCB1642), Riken Cell Bank

B1.2 実験手順

B1.2.1 QCMによるオリゴペプチド吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

1% SDS溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、濃硫酸:過酸化水素水=3:1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面にオリゴペプチド溶液(50 μ M細胞非接着性オリゴペプチド水溶液, 50 μ Mブリッジ型オリゴペプチド水溶液)を滴下し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

B1.2.2 オリゴペプチド修飾表面へのタンパクの非特異吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

1% SDS溶液を含ませた綿棒で電極表面を優しく擦り、純水で洗浄した。さらに、濃硫酸:過酸化水素水=3:1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面にオリゴペプチド溶液(50 μ M細胞非接着性オリゴペプチド水溶液, 50 μ Mブリッジ型オリゴペプチド水溶液)をそれぞれ滴下し、4 $^{\circ}$ Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

5) タンパク質の吸着

オリゴペプチド修飾電極に1 mg/mlフィブリノーゲン、1 mg/mlフィブロネクチン溶液をそれぞれ滴下し、室温で30分間放置した。

6) タンパク質吸着電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

B1.2.3 接着・非接着オリゴペプチド混合修飾表面における細胞接着挙動

1) 基板洗浄

カバーガラスを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分間浸漬し、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

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 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。

3) オリゴペプチドの修飾

細胞接着性オリゴペプチド：細胞非接着性オリゴペプチド = 100 : 0, 1 : 99, 0.1 : 99.9, 0.01 : 99.99, 0.001 : 99.999, 0 : 100 (Total conc. 50 μ M) のオリゴペプチド溶液に金基板をそれぞれ浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

4) 基板の滅菌

オリゴペプチドを修飾した金基板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滅菌し、 ϕ 35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

5) 細胞の播種

マウス線維芽細胞 3T3 を 10 %FBS 添加培地に、 5.0×10^5 cells/ml の密度で懸濁し、1 ディッシュあたり 2 ml 量、つまり 1.0×10^6 cells/ml の密度で細胞を播種した。

6) 接着細胞数のカウント

三時間培養後、金基板に接着した細胞数をカウントした。

7) 統計処理

Dunnett's test により、100%細胞接着性オリゴペプチド修飾表面との有意差を検定した。

B1.2.4 電気化学的な細胞脱離の評価

1) 基板洗浄

カバーガラスを 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 分間浸漬し、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

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 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。

3) 細胞接着性オリゴペプチドの修飾

金基板を 50 μ M 細胞接着性オリゴペプチド溶液に浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

4) 基板の滅菌

細胞接着性オリゴペプチドを修飾した金基板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滅菌し、 ϕ 35 mm の滅菌済ディッシュに入れた。

5) 細胞の播種

マウス線維芽細胞 3T3 を 10 %FBS 添加培地に 2.5×10^5 cells/ml の密度で懸濁し、1 ディッシュあたり 2 ml 量、つまり 5.0×10^5 cells/ml の密度で細胞を播種した。

6) 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内 (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂-Air) のもとで 24 時間培養した。

7) 電位の印加

細胞培養基板のパッドとなる部分の細胞および水滴を綿棒で除去し、これを作用極、市販の Ag/AgCl 電極を参照極、白金板を対極とし、三電極系を形成した (Fig. 2)。これらをポテンシostat に接続し、PBS 中で定電位 -1.0 V を一定時間印加した。

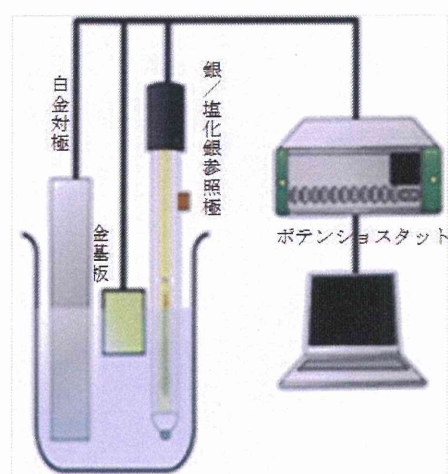


Fig. 2 三電極系および電気化学測定装置

8) 細胞数のカウント

電位印加後、基板を別のディッシュに移し、位相差顕微鏡画像をCCDカメラによって撮影した。撮影箇所は基板の中央付近を3箇所とした。撮影後、残存細胞数をカウントした。

B2. 両性イオンオリゴペプチドの最適化

オリゴペプチドの配列は、3つのセグメントに分けてデザインした。つまり、アンカー (C)、スペーサー (PPP、FFF等)、両性イオン部分 (KEKE、KEKEKEKE等) から構成される。そして、分子動力学計算により、これら3つのセグメントの合計80種類の組み合わせについて、二次構造を計算した。この結果、表面で密な自己組織化単分子膜を形成すると予想された4種類 (CPPPKKEKEKEKEK、CFFFKEKEKEKEKEKEKEK、CFFFKEKEKEK、及びCFKEKEKEKEK) について、実験的に、溶液中での二次構造、金表面への吸着量、ペプチド修飾表面の濡れ性、タンパクの非特異吸着抑制能の評価を行った。以上により、タンパクの非特異吸着および細胞接着を強く抑制する配列を設計した。

B2.1 実験装置と試薬・材料

【装置】

- ・ Quartz Crystal Microbalance (QCM), AFFINIX QN, Initium 社
- ・ スパッタデポジション装置、CFS-4ES-231、Shibaura Eletec
- ・ 円二色性分散計、J-820 (JASCO 製)
- ・ マイクロスコープ、VHX-S50 (KEYENCE 製)
- ・ 超純水製造装置 (Milli-Q Advantage A10, MILLIPORE製)

【試薬・材料】

- ・ カバーガラス
- ・ オリゴペプチド、CPPPKKEKEKEKEK (株式会社スクラム)
- ・ オリゴペプチド、CFFFKEKEKEKEKEKEKEK (株式会社スクラム)
- ・ オリゴペプチド：CFFFKEKEKEK, (株式会社スクラム)
- ・ オリゴペプチド：CFKEKEKEKEK, (株式会社スクラム)
- ・ フィブリノーゲン Sigma-Aldrich Japan

B2.2 実験手順

B2.2.1 CDスペクトルによる溶液中でのペプチド二次構造の評価

1) オリゴペプチド溶液の調整

0.1 mg/ml のオリゴペプチド溶液 (CPPPKKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEK, CFKEKEKEKEK) をそれぞれ調製し、光路長 1 mm のセルにそれぞれ 400 μ l ずつ滴下した。

2) CD スペクトルの測定

円二色性分散計にオリゴペプチド溶液を調製したセルをセットし、190 nm から 250 nm の波長において CD スペクトルを測定した。

B2.2.2 QCMによるオリゴペプチド吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

濃硫酸：過酸化水素水=3：1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が ± 3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面に 50 μ M のオリゴペプチド溶液 (CPPPKKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEK,

CFKEKEKEK)をそれぞれ滴下し、4 °Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

B2.2.3 ペプチド修飾表面の濡れ性の評価

1) 基板洗浄

カバーガラスを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分間浸漬し、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

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。

3)オリゴペプチドの修飾

金基板を50 μMオリゴペプチド溶液(CPPPKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK,CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)にそれぞれ浸漬し、一晩放置した後、純水で洗浄し、乾燥させた。

4) 接触角の測定

それぞれのオリゴペプチドを修飾した金基板に超純水40 μlを滴下し、マイクروسコープを用いて接触角を測定した。

B2.2.4 オリゴペプチド修飾表面へのタンパクの非特異吸着量の評価

1) 電極表面の洗浄

濃硫酸：過酸化水素水=3：1のピランハ溶液を滴下し、室温で5分間放置後、純水で洗浄した。

2) 未修飾電極の周波数測定

完全に乾燥させた電極を本体にセットした。周波数が±3 Hz/min程度に安定した時の値を未修飾時の周波数とした。

3) オリゴペプチドの修飾

電極表面に50 μMのオリゴペプチド溶液(CPPPKEKEKEKEK, CFFFKEKEKEKEKEKEK,CFFFKEKEK, CFKEKEKEK)をそれぞれ滴下し、4 °Cで一晩放置した。電極を純水で洗浄した。

4) オリゴペプチド修飾電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

5) タンパク質の吸着

オリゴペプチド修飾電極に1 mg/mlフィブリノーゲン、を滴下し、室温で30分間放置した。

6) タンパク質吸着電極の周波数測定

再び電極を本体にセットし、安定したときの値を読み取った。

B3. 多孔質メンブレン上からの細胞脱離

多孔質メンブレンとして、本研究ではセルカルチャーインサート(Cell Culture Insert)を用いた。このメンブレンは、ポリエチレンテレフタレート (PET) 製のフランジ部分とメンブレンから成る。メンブレンはエッチングによって数百ナノメートルの孔が空けられており、専用の培養プレートを用いることによって、液体培地に含まれる成分を細胞の管腔側と基底膜側の両方から供給でき、どちらかと言えばより生体内の環境に近い細胞培養を実現することができる。

この透過性メンブレンの孔サイズを変えることによって、細胞遊走・細胞浸潤アッセイや薬物透過アッセイ、2種類の細胞の共培養系を構築することもできる。とりわけ本実験では、細胞がプレート側に通り抜けられないように、φ400 nmのポアサイズのものを選択した。さらに、インサートとウェル間の物質の透過量を十分に確保するために、ポア密度の高いHDタイプのものを用い

た(Fig. 3)。ここでFig. 3は、多孔質メンブレンにスパッタリング装置を用いてCrを1分間スパッタした後、Auを2分間スパッタしたものを、電子顕微鏡にて撮影したものである。スパッタ後も直径約400 nmの貫通孔を形成しており、この孔からの培地供給によって細胞への酸素供給の律速が改善されると考えられる。Fig. 4は金をスパッタしたメンブレン容器の外観であり、シリコンリングは容器を固定するために使用した。

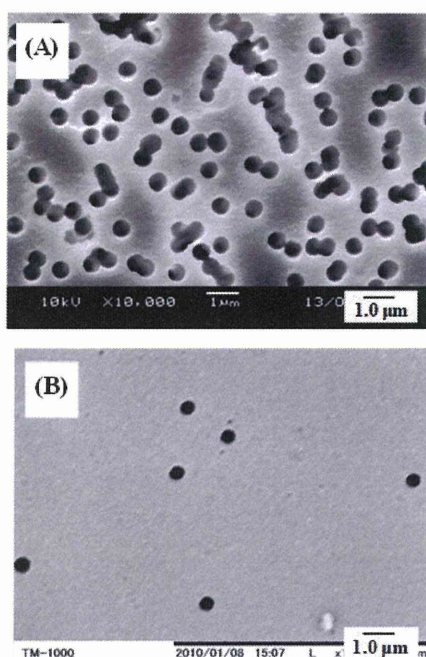


Fig. 3 多孔質メンブレンの電子顕微鏡写真
(A)高密度タイプ、(B)低密度タイプ

この多孔質メンブレンが細胞脱離に利用可能かどうかを評価するため、メンブレン上にオリゴペプチドを介して接着させたマウス線維芽細胞を、電気化学的に脱離させ、定量的評価を行った。

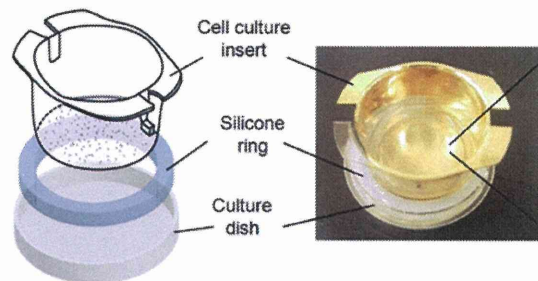


Fig. 4 金をコートした多孔質メンブレンの写真および培養システム

B3.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD(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
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液：Phosphate Buffered Saline：PBS-, GIBCO
- 2%パラホルムアルデヒド, Wako.
- 2.5%グルタルアルデヒド, Fluka.
- 1% 四酸化オスミウム(O_5O_4)PBS-溶液, CHIYODA JYUNYAKU Inc.

[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
- 電子顕微鏡ED-SEM, 日本電子

・Miniscope : 日立卓上顕微鏡TM-1000, 日立ハイテク

B3.2 実験手順

B3.2.1 シングル細胞の脱離

1) Au/Cr層のスパッタ

細胞培養用のCell Culture Insertをスパッタリング装置のチャンバーに装着し、出力100W、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。

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 5.0×10^4 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 1.0×10^5 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% CO₂-Airのもとで約12-18時間培養した。

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 V(vs Ag/AgCl)を1分間印加した後、軽くピペッ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加えてピペッティングし、15 mL遠心管に入れた。

8) 細胞数のカウント

脱離した細胞の入った計7本の遠心管を、遠心分離機で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10 mLとして懸濁した。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。

B3.2.2 電子顕微鏡による付着細胞の観察

1) 組織の固定

培養中のサンプルの培地を捨て、基盤をPBS-で洗浄し、2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒドPBS-溶液中に室温で1時間浸漬させた後、PBS-で洗浄した。

2) 細胞膜浸透化処理

1% 四酸化オスミウム(O₈O₄)PBS-溶液に基盤を浸漬させ、4°Cの冷蔵庫に1時間放置した後、PBS-で洗浄した。

3) エタノール脱水

30%、50%、70%、90%エタノールに、それぞれ室温で5分間ずつ基盤を浸水させることで徐々に脱水を行った。最後に100%エタノールを用いて、室温で5分間の脱水を3回行った。

B4 細胞シートの脱離・積層化

多孔質メンブレン上で細胞シートを構築し、通常の培養ディッシュ上において形成させた細胞シートと組織学的な比較および機能評価を行った。また、構築した細胞シートを回収し、それらを重ね合わせることで多層化細胞シートを作製した。さらに回収・積層化した細胞シートを、免疫染色等により、形態や機能の組織学的評価を行った。

B4.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD(a high pore density membrane), BD Falcon
- Cell Culture Insert, pore size 0.4, 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
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液: Phosphate Buffered Saline: PBS-, GIBCO
- QIAmp DNA Mini Kit from QIAGEN, USA.
- FDA: fluorescent diacetate, Wako Pure Chemicals.
- EB: ethidium bromide, Wako Pure Chemicals.

[装置]

- 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・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/ガルバナスタット: HA-151, Hokuto denko.
- Ag/AgCl 参照電極: #012167, BAS Inc.
- 位相差顕微鏡: IX-71, Olympus.

B4.2 実験手順

B4.2.1 多孔質メンブレン上での細胞シートの形成

1) ガラス基板の洗浄

濃硫酸: 過酸化水素水 = 3:1のピランハ溶液をガラス基板に滴下し、室温で20分間放置後、純水で洗浄した。これを2回繰り返した。

2) 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にてガラス基板と2種類の多孔質メンブレンに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。

3) オリゴペプチドの固定

0.5 mM オリゴペプチド水溶液を、金薄膜を形成した多孔質メンブレン、ガラス基板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。

4) 基板の滅菌

オリゴペプチドを固定したガラス基板と多孔質メンブレンを、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。

5) 細胞の播種

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

6) 細胞の培養

播種した細胞をインキュベータ内で37°C、5% CO₂-Airのもとで3週間培養した。また、メンブレンφ400 nm HDのものは、3日間・1週間・2週間・3週間それぞれ培

養した。

7) 組織の固定

培養した細胞シートを充分量の組織固定液である4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液に浸漬させ、4℃で一晩以上置いた。

8) 切片の作製およびH.E.染色

固定された組織を4%パラホルムアルデヒド/PBS溶液で満たし、液が漏れないように封をして、株式会社ケー・エー・シー バイオサイエンス事業部 病理部に送付し、切片作製およびH.E.染色を委託した。

B4.2.2 細胞シートの回収・積層化

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

0.5mM 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℃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 5.0×10^5 cells/mlの密度で懸濁し、1ディッシュ当たり2 ml量、つまり 1.0×10^6 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℃、5% CO₂-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 V(vs Ag/AgCl)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、φ3 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。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℃、5% CO₂-Airの雰囲気下で30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、積層化された細胞シートを形成した。

9) 染色溶液の調製

・FDAストック溶液：5mg FDA/ml DMSO

・EBストック溶液：40μg EB/ml PBS

上記溶液を調製した後、EB ストック溶液1 ml、FDAストック溶液2:1を混合し、これをFDA/EB染色溶液とした。

10) 組織の生細胞/死細胞の染色

サンプルの培地を捨て、PBSで洗浄しFDA/EB溶液に細胞シートを浸漬させ、CO₂インキュベータ内で5分間放置した後、PBS-溶液で洗浄した。蛍光顕微鏡により蛍光観

察を行った。

B5. マウス皮下への細胞シート移植

多孔質メンブレン上で作製・回収した細胞シートをヌードマウスの皮下に移植し、ホストへの生着やコラーゲンの発現を、組織切片の免疫染色によって組織学的に評価した。なお、動物実験は、名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程を遵守して実施した。

B5.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD(a high pore density membrane), BD Falcon
- Cell Culture Insert, pore size 0.4, BD Falcon
- Multiwell 6well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列：-CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- 正常ヒト皮膚線維芽細胞 Normal Human Dermal Fibroblasts (NB1RGB), Riken Cell Bank
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液 : Phosphate Buffered Saline : PBS-, GIBCO
- KSN/Slc nude mice (4週齢), 中部科学資材株式会社
- イソフルラン, 大日本住友製薬
- PKH26 red fluorescent cell linker, Sigma-Aldrich
- ベスキチン, UNITIKA LTD
- Monoclonal Rabbit Anti-Collagen I antibody(M0851), Abacam
- Goat Anti Rabbit IgG Antibody (Alexa Fluor488 Code A11034), Invitrogen
- PermaFluorAqueous mounting medium containing DAPI, Thermo Fisher Scientific LTD

[装置]

- 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・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/ガルバナスタット : HA-151, Hokuto denko.
- Ag/AgCl 参照電極 : #012167, BAS Inc.
- 蛍光顕微鏡 ; DC20, Olympus

B5.2 実験手順

B5.2.1 移植用細胞シートの作製・染色・回収

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℃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6 wellマルチウェルプレートに入れた。

4) 細胞の播種

正常ヒト皮膚線維芽細胞を10%FBS添加培地に 5.0×10^5 cells / mlの密度で懸濁し、1ディッシュ当たり2 ml量、つまり 1.0×10^6 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% CO₂-Airのもとで2週間培養した。

6) 細胞シートの膜染色

PKH26 red fluorescent cell linker溶液を培養した細胞シートの表面に滴下し、室温で5分間インキュベートした。

7) 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 V(vs Ag/AgCl)を5分間印加した。

8) 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、φ3 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。最後に、浮遊した細胞シートをピペットで回収した。

9) 核型検査

回収した細胞シートの一部 (PKH非染色群) は、DAPI染色とQバンド法 (ヘキストーキナクリン染色) 核型検査を行った。

B5.2.2 細胞シートの移植と組織切片の作製

1) 移植片の作製

染色した移植用細胞シートを、移植担体であるベスキチン(1.5 × 1.0 cm)上に展開した。

2) ノードマウスへの移植

4週齢のノードマウス(KSN/Slc)をイソフルランで麻酔後、背側に2箇所皮下ポケット

を作製し、ベスキチンと共に細胞シート片を移植した。1分後、ベスキチンのみを取り除き、挙上した皮弁を縫着した。なお、

3) 組織切片の作製

移植して1-2ヶ月後、移植片とその周辺部位を取り出し、組織切片を作製した。

4) 組織切片コラーゲンの染色

一次抗体反応にはMonoclonal Rabbit Anti-Collagen I antibodyを、二次抗体反応にはGoat Anti Rabbit IgG Antibodyを用いた。また、PermaFluorAqueous mounting medium containing DAPIを用いてカバーガラスに封入し、蛍光顕微鏡により蛍光観察を行った。

B6. 血管内皮細胞との共培養細胞シートの作製・回収および積層化

多孔質メンブレン上で線維芽細胞シートを回収・積層化することで、厚みのある細胞シートを構築させることができる。しかし、厚みが増せば増すほど、細胞シート内への酸素供給が律速となる。つまり、より厚みのある組織を構築するには、細胞シート内に血管構造を導入する必要がある。

そこで、血管構造を含んだ厚みのある細胞シートを作製するために、あらかじめ線維芽細胞シート内に血管内皮細胞を含有させた細胞シートを、メンブレン基板上でそれら2種類の細胞を共培養することによって構築した。メンブレン表面には、直径400 nmの貫通孔が多数形成されており、細胞層の上下に培地成分を置くことが出来るため、酸素や栄養供給の改善、また代謝産物の拡散促進が期待できる。

作製した共培養シートは、共焦点顕微鏡を用いて組織内部の血管内皮細胞の形態を観察し、また解析ソフトウェアを用いて定量評価した。さらに回収した共培養シート

を積層化することで、血管様構造を付与した多層化組織の作製を試みた。

B6.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- Cell Culture Insert, pore size 0.4HD (a high pore density membrane), BD Falcon
- Cell Culture Insert, pore size 0.4, BD Falcon
- Multiwell 6well, BD Falcon
- オリゴペプチド(アミノ酸配列: -CCR-RGD-WLC-), SIGMA-ALDRICH
- 正常ヒト皮膚線維芽細胞 Normal Human Dermal Fibroblasts (NB1RGB), Riken Cell Bank
- ヒト臍帯静脈血管内皮細胞 (GFP導入済): Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC, from Dr. J. Folkman, Children's Hospital, Boston)
- エタノール, 関東化学
- リン酸緩衝液: Phosphate Buffered Saline: PBS-, GIBCO
- 正常ヤギ血清 (X0907), DAKO
- Rabbit Anti-Fibronectin (LB-1027), LSL
- Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin (M0851), DAKO
- Goat Anti Mouse IgG Antibodies (Alexa Fluor488 Code A11001), Invitrogen
- Goat Anti Rabbit IgG Antibodies (Alexa Fluor568 Code A11011), Invitrogen
- DAPI-Flioromount-G (Code 0100-20), Southern Biotechnology Associa

[装置]

- 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
- スパッタデポジション装置: CFS-4ES-231, Shibaura Eletec.
- ポテンシオスタット/ガルバナスタット:

HA-151, Hokuto denko.

- Ag/AgCl 参照電極: #012167, BAS Inc.
- 共焦点顕微鏡: LSM700, ZEISS
- 3次元画像解析ソフトウェア: Imaris, Bitplane

B6.2 実験手順

B6.2.1 多孔質メンブラン上での共培養シートの作製・評価

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にてガラス基板と2種類の多孔質メンブランに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、金薄膜を形成した多孔質メンブラン、ガラス基板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ガラス基板と多孔質メンブランを、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

正常ヒト皮膚線維芽細胞を10% FBS添加培地に 3.25×10^5 cells / mlの密度で、またヒト臍帯静脈血管内皮細胞を 1.25×10^5 cells / mlの密度で懸濁し、メンブラン容器の上部に2 ml量、つまり 1.0×10^6 cells / dishの密度で細胞を播種した。一方、メンブラン容器の下部(6 wellマルチウェルプレート側)には、2.5 mLの10% FBS添加培地を入れた。

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% CO₂-Airのもとで1-2週間培養した。

6) 細胞シートの観察・評価

メンブレン基板上で所定時間培養した細胞シートをメンブレンごと切り出し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてGFP導入済の血管内皮細胞の形態を観察し、3次元の像を取得した。取得した画像をもとに、3次元画像解析ソフトウェアを用いて解析を行った。

B6.2.2 共培養シートの回収・積層化

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。

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

正常ヒト皮膚線維芽細胞を10% FBS添加培地に 3.25×10^5 cells / mlの密度で、またヒト臍帯静脈血管内皮細胞を 1.25×10^5 cells / mlの密度で懸濁し、メンブレン容器の上部に2 ml量、つまり 1.0×10^6 cells / dishの密度で細胞を播種した。一方、メンブレン容器の下部(6 wellマルチウェルプレート側)には、2.5 mLの10% FBS添加培地を入れた。

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% CO₂-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 V(vs Ag/AgCl)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、φ3 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。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% CO₂-Airの雰囲気下で30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、積層化された細胞シートを形成した。

9) アクチン・フィブロネクチン免疫蛍光2重染色

エタノールで脱パラフィン化し、正常ヤギ血清に20分間浸漬させ、非特異的反応のブロッキングをした。一次抗体反応には、Rabbit Anti-Fibronectin 1 μLとMonoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin 10 μLを489 μLの1% BSA/TBSで混合希釈したものを用い、室温で2時間インキュベートした。二次抗体反応には、Goat Anti Mouse I

gG Antibodies (Alexa Fluor488) 2 μ Lと Goat Anti Rabbit IgG Antibodies (Alexa Fluor568) 2 μ Lを596 μ Lの1% BSA/TBSで混合希釈したものを用い、室温で1時間インキュベートした。

最後に、DAPI-Flioromount-Gを用いてカバーガラスに封入し、蛍光顕微鏡と共焦点レーザー顕微鏡により蛍光観察を行った。

B7. 2液混合型ゼラチンハイドロゲルの作製

細胞シートを積層化し移植する際には、これらの操作を容易にするために、機械的に細胞シートを補助するものが必要である。そこで、生体材料を用いたハイドロゲルを利用し、移植部位に確実に固定する工夫を行った。生体の細胞外マトリックスは主にコラーゲン、グリコサミノグリカン、糖タンパクからなる。当初、ヒアルロン酸を主成分とするハイドロゲルを作製したが、時間とともに膨潤するという欠点があった。そこで本研究では、医療用ゲル材料として多用されているカルボキシメチルセルロース (CMC)と、細胞外マトリックスの骨格を形成し細胞の接着因子を持つコラーゲンの部分変性体であるゼラチン (Gelatin)をベースとし、ハイドロゲルを作製した。

B7.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- カルボキシメチルセルロース (Mw~90000) : Sigma-Aldrich
- 過ヨウ素酸ナトリウム Sodium periodate (M=213.89) : 和光純薬
- エチレングリコール Ethylene glycol (M=62.07) : 和光純薬
- ゼラチン Gelatin from porcine skin typeA : Sigma-Aldrich

- 1-エチル-3-カルボジイミド 1-ethyl-3-carbodiimido (M=191.7) : 和光純薬
- 1-hydroxybenzotriazole (M=135.12) : 和光純薬
- アジポヒドラジド Adipohydrazide (M=174.20) : 和光純薬
- ジメチルスルホキシド Dimethyl sulfoxide (M=78.14) : 和光純薬
- 塩酸 : 和光純薬
- 水酸化ナトリウム : 和光純薬
- 塩化ナトリウム sodium chloride (NaCl) (M=58.44) : 和光純薬
- エタノール ethanol (M=46.07) : 和光純薬
- トリニトロベンゼンスルホン酸 : 和光純薬
- t-BC : 和光純薬

[装置]

- 透析膜 MWCO 6-8000 : ThermoFisher
- 凍結乾燥機 : EYELA , FDU-1200
- 紫外可視光吸光度計 UVmini1240 : SHIMAZU,
- ダブルシリンジ : ニプロ
- 物性試験機 Texture analyzer : EKO
- 走査型電子顕微鏡 Miniscope : HITACHI

B7.2 実験手順

B7.2.1 CMC-CHOの合成 (Fig. 5)

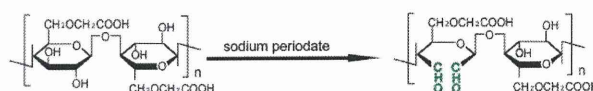


Fig. 5 CMC-CHOの合成スキーム

1) カルボキシメチルセルロース (CMC)の溶解

300 mlナスフラスコに1.5 gのCMCを加え、150 mlのmilliQ水で常温で1晩攪拌した。

2) 過ヨウ素酸ナトリウム溶液の滴下による開環反応

過ヨウ素酸ナトリウムを0.8038 g (1等量)を10 mlのmilliQ水に溶解させ、これをフラスコに滴下し、加えた。遮光のため、アルミホイルでフラスコを包み、2時間攪拌を行った。2時間後、未反応物除去のためにエチレングリコール 0.2 mlを加え、15分攪拌した。

3) 透析

MWCO=6-8000の透析膜で7日間透析を行った。(1日2回透析水を交換した)

4) 凍結乾燥

溶液を分注したのち凍結乾燥機を用いて、7日間凍結乾燥を行った。

5) NMRでの測定

核磁気共鳴装置を用いて¹HNMRスペクトルを測った。

6) CMC-CHOの保存

4 °Cのフリーザーで保存した。

B7.2.2 Gelatin-ADHの合成 (Fig. 6)

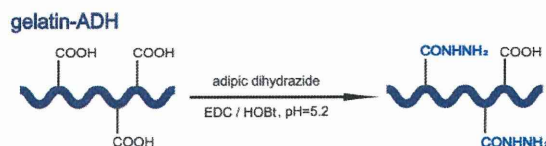


Fig. 6 Gelatin-ADHの合成スキーム

1) Gelatinの溶解

300 mlナスフラスコに1.0034 gのGelatin type-Aを加え、100 mlのmilliQ水で1晩攪拌して溶解させた。

2) ADHと Schiff-base reaction

Gelatin溶液にアジポアルデヒド1.41718 gを入れ、透明になるまで1時間攪拌した。

3) EDC試薬による反応

1時間後、NaOH, HClを用いて、pHを7程度に調整し、HOBt溶液 (HOBt 0.15 gに

DMSO 1.4 ml, milliQ 1.0 mlを混合)をパスツールピペットで全量滴下した。その後、同様にEDC溶液 (EDC 0.15 gにDMSO 0.6 ml, H₂O 0.6 mlを混合)をパスツールピペットで全量滴下し、pHを5~6の間に調整した。(以後、4時間、30分おきにpH調整を行った)さらに、1晩攪拌を行った。

4) 透析

翌日から、透析膜 (MWCO=6-8000)で7日間透析を行った。

5) 凍結乾燥

溶液を分注したのち凍結乾燥機を用いて、7日間凍結乾燥を行った。

6) Gelatin-ADHの溶解

凍結乾燥をしたものを5 wt%のNaCl溶液に溶かした。(Gelatin-ADH濃度5-10 mg/ml)

7) エタノール再沈殿

Ethanol 1 L中にNaClに溶解したGelatin-ADH溶液を攪拌しながら滴下し、Gelatin-ADHを再沈殿させた。30分攪拌させたのち、これを遠心分離機で2500回転、4分間遠心分離することでGelatin-ADH再沈殿を回収した。

8) 透析

回収したGelatin-ADHを100 mlのmilliQ水に加え2時間攪拌及び溶解したのち、再度、7日間透析を行った。

9) 濾過

透析後 (透析開始7日目)、ろ紙による沈殿の濾過を行った。

10) 凍結乾燥

50 ml遠心管に移し、7日間凍結乾燥を行った。

11) NMRでの測定

核磁気共鳴装置を用いて¹HNMRスペクトルを測った。

12) Gelatin-ADHの保存

4°Cのフリーザーで保存した。

13) TNBS溶液の調整

トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) 63.06 mgを1 mlのmilliQ水に溶解し5 wt%のTNBS溶液 (179.57 mM)を作製した。この5 wt%のTNBS溶液200 mlを800 mlのmilliQ水に溶解し、1 wt%のTNBS溶液を作製し、さらに、この1 wt%のTNBS溶液200 mlを9.8 mlのmilliQ水に加え、0.02 wt%のTNBS溶液 (0.72 mM)を作製した。

14) t-BC溶液の調整

t-BC 132.16 mgを10 mlのmilliQに加える (100 mM)。この100 mMの t-BC 溶液0.1 mlを9.9mlのmilliQ水に溶解し、1 mMのt-BC 溶液を作製した。

15) Gelatin溶液の調整

Gelatin 40 mgを2 mlのmilliQ水に溶解し、2 wt%のGelatin溶液を作製した。

16) Gelatin-ADH溶液の調整

Gelatin-ADH 40mgを2 mlのmilliQ水に溶解し、2 wt%のGelatin-ADH溶液を作製した。

17) サンプルの調整

24wellプレートにt-BC溶液100 wt%、50 wt%、25 wt%、12.5 wt%、6.3 wt%、3.2 wt%、1.0 wt%、0.5 wt%、0.25 wt%、0.125 wt%、0.063 wt%、0.032 wt%をそれぞれのwellに1 mlずつ加えた。同様に、Gelatin溶液およびGelatin-ADH溶液においても、0.6 wt%、0.5 wt%、0.4 wt%、0.25 wt%、0.2 wt%、0.125 wt%、0.1 wt%、0.062 wt%、0.05 wt%をそれぞれのwellに1 mlずつ加えた。

18) TNBS試薬との反応

それぞれのwellにTNBS溶液を1 mlずつ加え、37°Cのインキュベータで半日間、反応させた。

19) 吸光度測定

334 nmの吸光波長で吸光度測定を行った。この時、Gelatin-ADH溶液は同じ濃度のGelatin溶液を0点補正に用いた。

B7.2.3 Gelatin-ADHとCMC-CHOのゲル化 (Fig. 7)

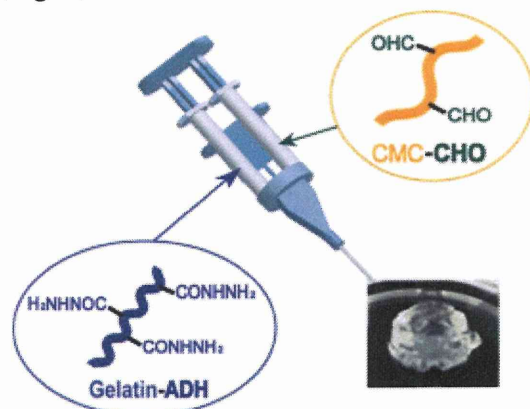


Fig. 7 ダブルシリンジを用いたゲル化

1) Gelatin-ADH, CMC-CHOの溶解

Gelatin-ADHを2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%の濃度になるようPBSに溶解した。同様にCMC-CHOを2 wt%、4 wt%、6 wt%の濃度になるようにPBSに溶解した。

2) Gelatin-ADHとCMC-CHOのゲル化

これら2つの原料をGelatin-ADH 2.5 wt% - CMC-CHO 2.0 wt%、Gelatin-ADH 5.0 wt% - CMC-CHO 4.0 wt%、Gelatin-ADH 7.5 wt% - CMC-CHO 6.0 wt%の組み合わせでダブルシリンジを使ってゲル化させた。

3) Gelatin-CMCハイドロゲルのヤング率評価

得られた3種類の濃度のGelatin-CMCハイドロゲルの破壊強度を物性試験機により測定し、ヤング率を評価した。

B7.2.4 Gelatin-CMCハイドロゲルの孔径評価

1) Gelatin-CMCハイドロゲルの凍結乾燥

作製した3種類の濃度のGelatin-CMCハイドロゲルを液体窒素で急冷させ、凍結乾燥を行った。

2) SEMによる観察

得られた凍結乾燥ゲルの切片を切断し走

査型顕微鏡によりゲルの孔径を評価した。

B7.2.5 Gelatin- CMCハイドロゲルの生分解性評価

1) Gelatin- CMCハイドロゲルの分解評価

作製した3種類の濃度のGelatin-CMCハイドロゲルを培養培地中に浸漬させ、ゲル重量から生分解性を評価した。

B8. 細胞を用いたハイドロゲルの評価

B8.1 実験装置と試薬・材料

[試薬]

- ・ ヒト臍帯由来血管内皮細胞
- ・ 血管内皮細胞用増殖培地 EBМ-2・添加因子セット：三光純薬
- ・ リン酸緩衝生理食塩水Phosphate Buffered Saline：GIBCO.
- ・ フルオロセインジアセテート fluorescent diacetate：和光純薬
- ・ 臭化エチジウム ethidium bromide：和光純薬
- ・ ローダミン Rhodamine:
- ・ DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole：Sigma Aldrich

[装置]

- ・ 位相差蛍光顕微鏡：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
- ・ ダブルシリンジ：ニプロ
- ・ 48wellプレート
- ・ スパッタデポジション装置 CFS-4ES-231：Shibaura Electec.
- ・ ポテンシオスタット／ガルバノスタットHA-151：Hokuto denko.

- ・ Ag/AgCl参照電極#2080A：HORIBA.

B8.2 実験手順

B8.2.1 ハイドロゲル原料の細胞毒性評価

1) GFP-HUVEC播種

GFP-HUVECを48wellプレートに 1×10^4 cells/dishで播種し、1日間培養した。

2) CMC-CHO, Gelatin-ADH溶液の調整

凍結乾燥したCMC-CHO、Gelatin-ADHをPBSでCMC-CHO 2.0 wt%、4.0 wt%、6.0 wt%、Gelatin-ADH 2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%となるように希釈した。

3) CMC-CHO, Gelatin-ADHの混濁

溶解したゲル溶液(CMC-CHO 2.0 wt%、4.0 wt%、6.0 wt%、Gelatin-ADH 2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%)をそれぞれwell内に0.5 mlずつ加え、CO₂ インキュベータ内で培養を行った。

4) 臭化エチジウムによる死細胞染色

臭化エチジウムによって死細胞染色を行った。

B8.2.2 CMC-Gelatinハイドロゲルの細胞接着評価

1) CMC-CHO, Gelatin-ADH溶液の調整

凍結乾燥したCMC-CHO、Gelatin-ADHをPBSでCMC-CHO 2.0 wt%、4.0 wt%、6.0 wt%、Gelatin-ADH 2.5 wt%、5.0 wt%、7.5 wt%となるように希釈した。

2) CMC-CHO, Gelatin-ADHゲルの作製

溶解した2液をダブルシリンジを用いて混合することでゲル化させ、φ35 mm dishをコーティングした。

3) GFP-HUVEC播種

GFP-HUVECを 3×10^4 cells/dishで播種した。

4) 生/死細胞染色

フルオロセインジアセテートと臭化エチジ