

Fig.6. Mass Chromatograms of Sample No.1  
(m/z 201, 160, 129)

#### 4. 今後の検討課題

オクチル酸スズは、今回の抽出条件で100%オクチル酸になるとは限らず、逆に抽出過程でオクチル酸が分解する可能性も考えられた。また、ポリマー合成段階で既にオクチル酸スズがオクチル酸に分解していることも考えられた。そこで、今回の抽出条件下で（アセトン-ヘキサン（3：7）混液20mlに濃塩酸2滴（200 $\mu$ l）を加えて37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう）、20 $\mu$ gと200 $\mu$ gのオクチル酸スズの添加回収実験を行った。その結果、100%オクチル酸にはならず、計算値の60%程度のオクチル酸しか検出できなかった。さらに、200 $\mu$ gのオクチル酸スズとデカン酸の同時添加回収実験では、オクチル酸は生成予想量の60%であり、デカン酸は90%以上の回収率が得られた。つまり、今回の抽出条件では、デカン酸はオクチル酸スズの内部標準としては適していないと考えられた。そこで、オクチル酸の定量値も、デカン酸を用いた内部標準法ではなく、絶対検量線法で値を算出した。しかし、食品用容器の安全性評価や生体影響研究など<sup>3-8)</sup>においては、オクチル酸の定量が必要とされている。今回の実験結果から、デカン酸のTMS誘導体はオクチル酸誘導体と同程度の反応効率を示し、同じ質量イオンのm/z 129をもつ。さらに回収率も良好であった。つまり、デカン酸は、オクチル酸のGC/MSによる定量法の内部標準物質として応用できるという事実がわかった。

本稿で報告したデータは、オクチル酸スズの定量値ではなく、あくまで近似値である。分解した後のスズの定量値ともあわせ、より正確な値を求めていく必要がある。さらに今後は、オクチル酸スズを誘導体化して定量する方法を検討していく予定である。

## まとめ

ポリ乳酸プラスチックの重合触媒として用いられ、製品に残留しているオクチル酸スズ量を予測するため、塩酸酸性下での分解産物であるオクチル酸の定量法を確立した。オクチル酸は、塩酸含有のアセトン-ヘキサン（3：7）混液を用い、37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう抽出した。抽出液をトリメチルシリル（TMS）誘導体化してGC/MSで測定した。カラムは、DB-5 ms(0.25mm $\phi$ ×25m、膜厚 0.25 $\mu$ m)を用い、m/z 201のイオンで定量した。4試料中2試料からオクチル酸が検出された。平均定量値は、オクチル酸スズに換算して、134.4 $\mu$ g/g（n=3、CV=14.3%）及び6.5 $\mu$ g/g（n=3、CV=28.7%）であり、それぞれ同じ濃度レベルであった。

## 文 献

- 1) 角田正史, 押野貴之, 伊藤京子, 井上葉子, 三木猛生, 工藤雄一朗, 佐藤敏彦, 相澤好治, 土屋利江: マウス小脳由来アストロサイト系細胞を用いたジブチルスズ, オクチル酸スズ, ポリ乳酸ラクチドの毒性評価, 第13回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集, (2006)
- 2) 河村葉子, 前原玉枝, 鈴木 隆, 山田 隆: ガスクロマトグラフィー/原子発光検出法(GC/AED)による食品用器具・容器包装及び玩具中の有機スズ化合物の分析, 食衛誌, **41**(4), 246~253(2000)
- 3) Stingel, D., Feldmeier, P., Richling, E., Kempf, M., Els, S., Labib, S. and Schreier, P.: Urinary 2-ethyl-3-oxohexanoic acid as major metabolite of orally administered 2-ethylhexanoic acid in human, *Mol Nutr Food Res.*, **51**(3), 301~306(2007)
- 4) Elss, S., Grunewald, L., Richling, E. and Schreier, P.: Occurrence of 2-ethylhexanoic acid in foods packed in glass jars, *Food Addit Contam.*, **21**(8), 811~814(2004)
- 5) Wahl, HG, Hong, Q., Stube, D., Maier, ME., Haring, HU. and Liebich, HM.: Simultaneous analysis of the di(2-ethylhexyl) phthalate metabolites 2-ethylhexanoic acid, 2-ethyl-3-hydroxyhexanoic acid and 2-ethyl-3-oxohexanoic acid in urine by gas chromatography-mass spectrometry, *J Chromatogr B*

*Biomed Sci Appl.*, **758**(2), 213~219(2001)

- 6) Walker, V. and Mills, GA.: Urine 4-heptanone: a beta-oxidation product of 2-ethylhexanoic acid from plasticisers, *Clin Chim Acta.*, **306**(1-2), 51~61(2001)
- 7) Ziesmann, J., Valterova, I., Haberkorn, K., de Brito Sanchez, MG. and Kaissling, K.: Chemicals in laboratory room air stimulate olfactory neurons of female *Bombyx mori*, *Chem Senses.*, **25**(1), 31~37(2000)
- 8) Kroger, S.: Gas chromatographic determination of 2-ethylhexanoic acid in urine as its pentafluorobenzyl ester, *Analyst*, **114**(12), 1647~1648(1989)

キャピラリー電気泳動法によるアルカリ性洗剤中のナトリウムイオン、  
カリウムイオン及びモノエタノールアミンの分析

伊佐間和郎<sup>#</sup>・鹿庭正昭・土屋利江

Analysis of Sodium Ion, Potassium Ion and  
Monoethanolamine in Alkaline Cleaners by Capillary Electrophoresis

Kazuo Isama<sup>#</sup>, Masa-aki Kaniwa, Toshie Tsuchiya

Japanese law for the control of household products containing harmful substances provides the volume of sodium hydroxide and potassium hydroxide in household cleaners with liquid form must not exceed 5%. The alkali volume is determined by acid-base titration which is the legally authorized method. The cleaner which contained monoethanolamine (MEA) in addition to sodium hydroxide is marketed recently. The MEA is not regulated by the law, but it is notorious as skin sensitizer. It is necessary to measure the concentration of MEA. Therefore, we applied capillary electrophoresis to the simultaneous determination of sodium ion, potassium ion and MEA. We analyzed 7 commercial alkaline cleaners, and sodium ion was detected from all products but potassium ion was not detected. Moreover, MEA was detected with concentration of 16.3 mg/ml from one product. Capillary electrophoresis is useful for the simultaneous determination of sodium ion, potassium ion and MEA in alkaline cleaners.

Keywords: capillary electrophoresis, alkaline cleaner, sodium ion, potassium ion, monoethanolamine

## 1. 緒言

「有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律」(昭和48年法律第112号, 家庭用品規制法)において, 住宅用洗剤に含まれる塩化水素又は硫酸の含有量は10%以下並びに家庭用洗剤に含まれる水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムの含有量は5%以下とされている。そして, それらの定量法として現行の基準では, 塩化水素又は硫酸では0.1 mol/l水酸化ナトリウム溶液並びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムでは0.1 mol/l塩酸による中和滴定法がそれぞれ採用されている。現行の中和滴定法は, 特別な装置を必要とせず, 簡便で定量精度も十分である。しかし, 最近, 規制対象である塩化水素又は硫酸並びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムを規制上限まで加えた上に, さらに規制対象外の酸又はアルカリを加えて洗浄効果を高めた洗剤がみられる<sup>1, 2)</sup>。こうした製品の場合, 規制対象である塩化水素又は硫酸並

びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウム自体は基準値以内であっても, 中和滴定法による検査では基準を超える結果が得られるという問題がある。また, 中和滴定法では, 酸又はアルカリの種類を同定することもできない。

規制対象外の酸を含む酸性洗剤の分析については, イオンクロマトグラフ法とキャピラリー電気泳動法とを比較した報告がある<sup>1)</sup>。塩化水素及び硫酸の分析において, イオンクロマトグラフ法はクエン酸及びリンゴ酸を含む場合には問題があるが, キャピラリー電気泳動法は規制対象外の無機酸及び有機酸を含む場合も有用である<sup>1)</sup>。一方, アルカリ性洗剤に含まれる規制対象外のアルカリ成分であるモノエタノールアミン (MEA) をガスクロマトグラフ法で定量した報告がある<sup>2)</sup>。

我々は, アルカリ性洗剤を対象として, キャピラリー電気泳動法を用いて, ナトリウムイオン ( $\text{Na}^+$ ) 及びカリウムイオン ( $\text{K}^+$ ) を直接定量すると共に, 規制対象外のアルカリ成分であるMEAの同時定量分析を行った。

## 2. 実験方法

<sup>#</sup> To whom correspondence should be addressed:  
Kazuo Isama; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo  
158-8501, Japan; Tel: 03-3700-1141; Fax: 03-3700-6950;  
E-mail: isama@nihs.go.jp

### 2-1. 試料

平成18年度に東京都内の小売店で購入した、製造販売会社が異なるアルカリ性洗剤7製品 (Table 1) を試料として用いた。

### 2-2. 試薬

標準品として、容量分析用の水酸化ナトリウム溶液及び水酸化カリウム溶液並びに試薬特級のモノエタノールアミンを和光純薬工業株式会社から購入した。また、試験溶液の調製等に用いた純水は、純水製造装置 Elix UV 5 (日本ミリポア株式会社) 及び超純水製造装置 Milli-Q Synthesis A10 (日本ミリポア株式会社) を用いて水道水から製造した。

### 2-3. キャピラリー電気泳動

キャピラリー電気泳動装置はCAPI-3300システム (大塚電子株式会社) を用いた。

泳動条件は、キャピラリー: フューズドシリカ (内径 75  $\mu\text{m}$   $\times$  有効長 48 cm, 大塚電子株式会社), 緩衝液: 10 mM イミダゾール, 5 mM 2-ヒドロキシイソ酪酸, 2 mM 18-クラウン-6-エーテル及び0.2w% 酢酸, 電圧: 10.0 kV, 温度: 25.0 $^{\circ}\text{C}$ , 検出波長: 210 nm並びにサンプル注入: 落差法 (25 mm, 30 sec) とした。

### 2-4. 測定精度推定

キャピラリー電気泳動の測定精度解析にはFunction of Mutual Information (FUMI) 理論<sup>3)</sup>に基づくソフトウェアTOCO version 2.0 (FUMI理論研究会) を用いた。標準溶液の電クロフェログラムにおけるシグナル及びノイズから本測定条件における測定精度プロファイルを作成し、検出限界及び定量限界を算出した。

### 2-5. 定量法

試料を純水で正確に1,000~10,000倍に希釈した溶液をキャピラリー電気泳動の試験溶液とした。

試験溶液の電クロフェログラムから $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 及びMEAのピーク面積を求めた。水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及びMEAの標準溶液を用いて作成した検量線から試験溶液中の濃度を求め、試料中の $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 及びMEAの濃度を算出した。

## 3. 結果

### 3-1. 標準溶液の電クロフェログラム

水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及びMEAの混合標準溶液を用いた検討から、本測定条件において $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ 及びMEAのピークは良好に分離した (Fig. 1)。

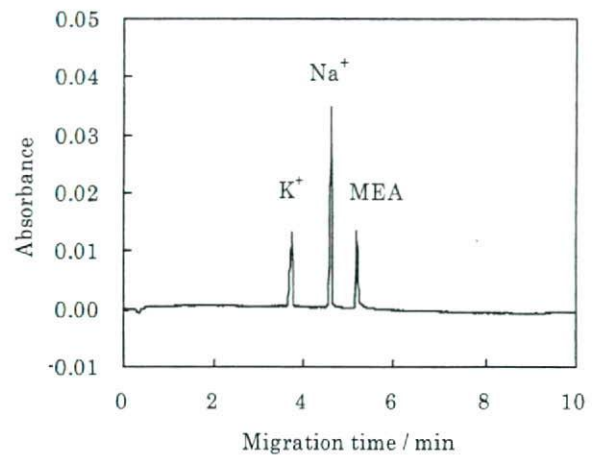


Fig. 1 Electropherogram of the standard solution<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> The standard solution contained 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of  $\text{Na}^+$ , 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of  $\text{K}^+$  and 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of MEA.

Table 1 Samples of alkaline cleaners and those quality labels

No.	品名	液性	成分
1	カビ取り用洗剤	アルカリ性	次亜塩素酸塩, 水酸化ナトリウム (0.5%), 界面活性剤 (アルキルアミノキシド)
2	カビ取り用洗剤	アルカリ性	次亜塩素酸塩, 水酸化ナトリウム (0.6%), 界面活性剤 (アルキルアミノキシド), 泡調整剤
3	トイレ用洗剤	アルカリ性	界面活性剤 (アルキルアミノキシド), 水酸化ナトリウム (1%), 次亜塩素酸塩
4	トイレ・浴室・台所用品用洗剤	アルカリ性	次亜塩素酸ナトリウム, 界面活性剤 (アルキルアミノキシド), 水酸化ナトリウム (1.4%)
5	排水パイプ用洗剤	アルカリ性	水酸化ナトリウム (1%), 次亜塩素酸塩, 界面活性剤 (アルキルアミノキシド)
6	排水パイプ用洗剤	アルカリ性	水酸化ナトリウム (4%), 次亜塩素酸ナトリウム, 界面活性剤 (アルキルアミノキシド)
7	油汚れ用洗剤	アルカリ性	ポリオキシエチレンアルキルエーテル, 水酸化ナトリウム (4.6%), 溶剤 (グリコールエーテル), 増粘剤

The alkaline cleaners were purchased at retail stores in Tokyo in 2006. The manufacturers of all samples were different.

### 3-2. 検量線及び測定精度推定

測定対象である $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 及びMEAの本測定条件における検量線をFig. 2に示した。検討した濃度範囲において、測定対象物質の濃度とピーク面積との間には、いずれも相関係数が0.9999を超える良い直線関係が認められた。

本測定条件における各測定対象物質の濃度と相対標準偏差(RSD)との関係を表す測定精度プロファイルを図3に示した。33%のRSDが得られるときの濃度を検出限界及び10%のRSDが得られるときの濃度を定量限界と定義するとき、各測定対象物質の検出限界及び定量限界は、試験溶液中の濃度としてTable 2のように算出された。

### 3-3. 市販製品の分析

試料は純水で希釈するだけで分析が可能であり、検出されたピークはいずれも高い対称性を示した。 $\text{Na}^+$ が検出されたサンプル6と、 $\text{Na}^+$ 及びMEAが検出されたサンプル7のエレクトロフェログラムをFig. 4に例示した。各試料中の $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 及びMEAの分析結果をTable 3に示した。7製品中、水酸化カリウムを配合するものは無く、MEAを配合するものは1製品あった。

### 4. 考察

家庭用品規制法では、住宅用洗剤に含まれる塩化水素又は硫酸は、皮膚障害、粘膜の炎症及び吸入によって肺障害を起こす毒性があり、酸の量として10%以下及び所定の容器強度を有することと基準が設けられている。また、家庭用洗剤に含まれる水酸化カリウム又は水酸化ナトリウムは、皮膚障害及び粘膜の炎症を起こす毒性があり、アルカリの量として5%以下及び所定の容器強度を有することと基準が設けられている。そして、現行

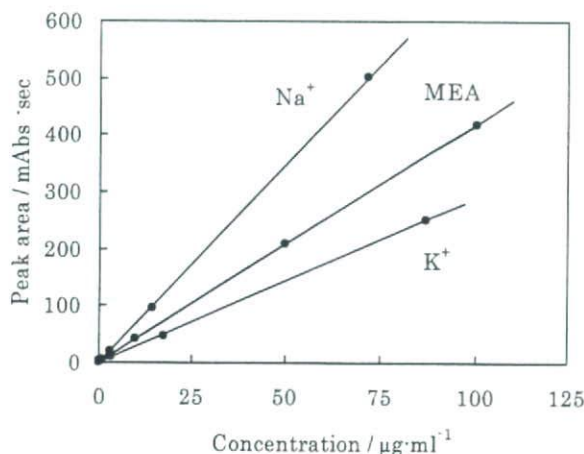


Fig. 2 Calibration curves of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and MEA

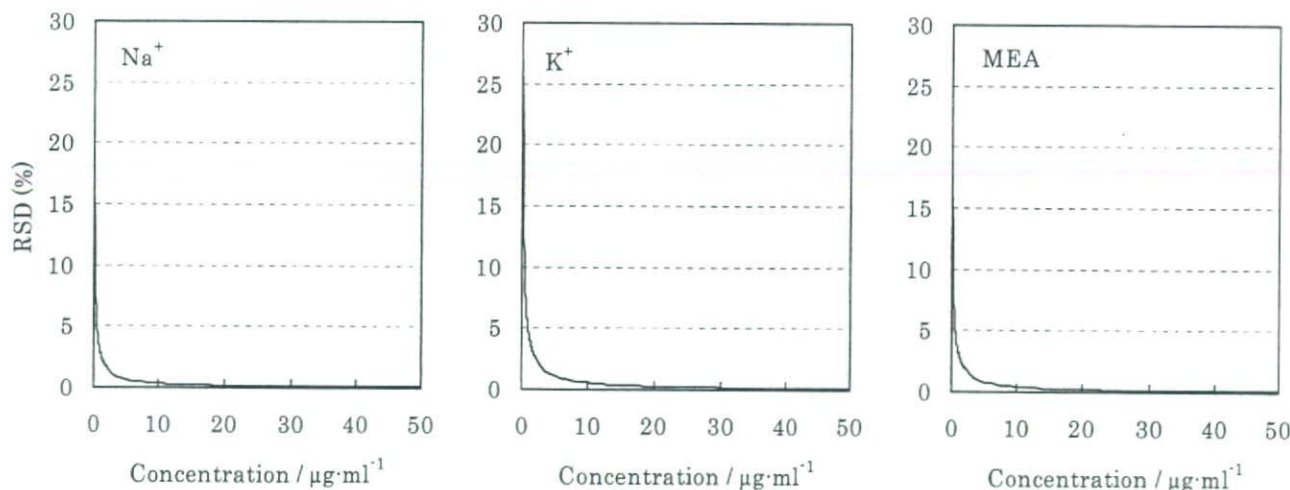


Fig. 3 Measurement precision profiles of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and MEA<sup>a)</sup>

<sup>a)</sup> The measurement precision profiles were made with TOCO version 2.0 by the signals and noise on the electropherograms of standard solutions.

Table 2 Detection limits and determination limits of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  and MEA

Test chemical	Detection limit / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$	Determination limit / $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$
$\text{Na}^+$	0.0810	0.2696
$\text{K}^+$	0.1844	0.6142
MEA	0.1267	0.4224

The detection limit and determination limit in the test solution were calculated with TOCO version 2.0 by the signals and noise on the electropherograms of standard solutions.

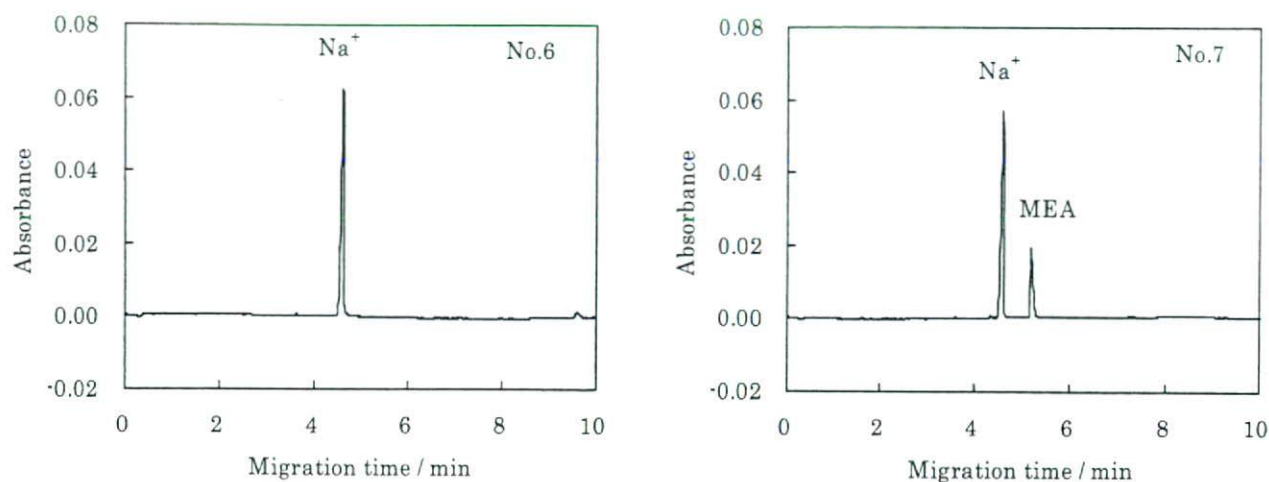


Fig. 4 Electropherograms of sample No. 6 and No.7 of alkaline cleaners

Table 3 Contents of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and MEA in alkaline cleaners

No.	Concentration / mg·ml <sup>-1</sup>		
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	MEA
1	12.8	ND <sup>a)</sup>	ND
2	15.0	ND	ND
3	17.7	ND	ND
4	28.3	ND	ND
5	18.1	ND	ND
6	35.0	ND	ND
7	32.4	ND	16.3

Values are expressed as means at 1-3 times of measurement. <sup>a)</sup> Not detected.

の基準では、それらの定量法として中和滴定法が採用されている。しかし、規制対象外の酸又はアルカリを含有する洗浄剤では、規制対象である塩化水素又は硫酸並びに水酸化カリウム又は水酸化ナトリウム自体は基準値以内であっても、中和滴定法による検査では基準を超えることがある。そこで、洗浄剤中の酸又はアルカリの種類を同定できる分析法の導入が図られている。

MEAには皮膚感作性があり、MEAによるアレルギー性接触皮膚炎の症例が報告されている<sup>4-7)</sup>。Geierらの調査では、ドイツの金属加工労働者におけるMEAのパッチテスト陽性率は11.6%にもなる<sup>8)</sup>。サンプル7は16.3 mg/mlのMEAを含有していたが、作業時に炊事用ゴム手袋を着用すること、スプレー時に目や皮膚に付着しないよう注意すること、子供の手が届くところに置かないことなど使用上の注意が表示されており、適正に使用すればアレルギー性接触皮膚炎を起こすことは少ないと思われる。

キャピラリー電気泳動法は、イオンクロマトグラフ法と同様に、毒性の本体になるとと思われる水素イオン及び水酸化物イオンそのものを分析することはできず、それ

らの対イオン（塩化物イオンやNa<sup>+</sup>など）を分析の対象としている。したがって、製品中に規制対象外の塩化物やナトリウム塩などを含む場合には、規制対象物質を正確に定量することは困難である。しかし、基準値を超える酸及びアルカリに相当する量の対イオンが含まれていることを確認することは可能である。さらに、規制対象外の酸又はアルカリを分析することができるという利点もある。

キャピラリー電気泳動法は複雑な前処理を必要とせず、アルカリ性洗浄剤に含まれるNa<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>及びMEAの同時定量が可能であった。規制対象外のアルカリ成分であるMEAを迅速・簡便に定量でき、家庭用品規制法に基づく試買試験のスクリーニングとして有効である。現行の家庭用品規制法では、住宅用洗浄剤において塩化水素及び硫酸以外の酸並びに家庭用洗浄剤において水酸化カリウム及び水酸化ナトリウム以外のアルカリを分析する必要はないので、中和滴定法による基準の設定が最適であろう。しかし、規制対象外の酸及びアルカリを分析するには、キャピラリー電気泳動法が有用であることが確認された。キャピラリー電気泳動法は、分析感度・分

析時間・ランニングコストなどの点で優れた分析法のひとつである。更に、試料及び試薬は少量しか必要とせず、ローエミッションであるため、公定分析法への導入が期待されている<sup>9)</sup>。

## 文 献

- 1) Ooshima, T.: *Seikatsu Eisei*, 51, 11-18 (2007)
- 2) 大嶋智子：第40回全国衛生化学技術協議会年会講演集, 194-195 (2003)
- 3) Hayashi, Y. and Matsuda, R.: *Anal. Chem.*, 66, 2874-2881 (1994)
- 4) Koch, P.: *Contact Dermatitis*, 33, 273 (1995)
- 5) Bhushan, M., Craven, N.M. and Beck, M.H.: *Contact Dermatitis*, 39, 321 (1998)
- 6) Jensen, C.D. and Andersen, K.E.: *Contact Dermatitis*, 49, 45-46 (2003)
- 7) Ulrich, S., Skudlik, C. and John, S.M.: *Contact Dermatitis*, 56, 292-293 (2007)
- 8) Geier, J., Lessmann, H., Dickel, H., Frosch, P.J., Koch, P., Becker, D., Jappe, U., Aberer, W., Schnuch, A. and Uter, W.: *Contact Dermatitis*, 51, 118-130 (2004)
- 9) 本田進, 寺部茂：キャピラリー電気泳動—基礎と実際—, 講談社, 東京 (1995)

ORIGINAL ARTICLE

Bayar Hexig, PhD · Ryusuke Nakaoka, PhD  
Toshie Tsuchiya, PhD

## Safety evaluation of surgical materials by cytotoxicity testing

**Abstract** The cytotoxicity of three kinds of commercially available absorbable hemostats [oxidized cellulose (Surgicel, gauze and cotton types), microfibrillar collagen (Avitene), and cotton-type collagen (Integran)] and one adhesion barrier [sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose membrane (Seprafilm)] were comparatively assessed by a colony assay using V79 cells and a minimum essential medium (MEM) elution assay in combination with a neutral red assay using L929 cells. Strong cytotoxicity was detected for Surgicel by both the MEM elution assay and the colony assay. For Avitene, both methods revealed weak cytotoxicity. For Seprafilm, no cytotoxicity was detected by the MEM elution assay, while a moderate degree of cytotoxicity was observed in the colony assay. For Integran cytotoxicity was not detected by either the MEM elution or the colony assay. The results of the different methods showed some inconsistency in terms of the degree of cytotoxicity of the materials. It is proposed that the combination of two or more sensitive cytotoxicity testing methods for the evaluation of biomaterials is necessary to avoid false-negative results for biomaterials at the preclinical stage. Furthermore, investigation of the correlation between the cytotoxicity and the extraction period of the surgical materials is helpful for predicting the effect of prolonged *in vivo* use of biomaterials on surrounding cells, tissues, and organs.

**Key words** Safety evaluation · Surgical materials · MEM elution assay · Colony assay

### Introduction

Many types of biomaterials have been utilized in surgical techniques and tissue engineering. Assessment of the cyto-

toxicity based on several sensitive and quantitative cytotoxicity testing methods is a necessary step in the evaluation of biocompatibility of all biomaterials. In particular, it is an important step in the safety evaluation of implants, absorbable biomaterials, and biomedical devices. At present, although a number of cytotoxicity testing methods have been developed and safety evaluations are being standardized and described by various national and international standardization institutes,<sup>1,2</sup> there are still many reports of problems caused by clinically utilized biomaterials.<sup>3–9</sup> To avoid false-negative results, the safety of biomaterials should be sufficiently assessed at the preclinical stage.

In the present study, we comparatively assessed the cytotoxicity of three kinds of commercially available absorbable hemostats [oxidized regeneration cellulose (Surgicel, gauze and cotton types), microfibrillar collagen (Avitene), and cotton-type collagen (Integran)] and an adhesion barrier [sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose membrane (Seprafilm)] by two different cytotoxicity testing methods. These surgical materials have been widely utilized in clinical applications; however, in reports by the US Food and Drug Administration of clinical problems caused by biomedical devices, Seprafilm, Surgicel, and Avitene were reported to have been implicated in 226, 44, and 24 events, respectively, in the period from January 1, 1996, to August 30, 2006.<sup>10</sup> It was reported that inhibition of bone regeneration, foreign-body reaction, inflammation reaction, and abscess formation were caused by using these materials in the clinical setting. Although the frequency of significant adverse reactions was not clear, wound infection, abscess, peritonitis, and sepsis have also been reported.<sup>10</sup>

The MEM elution assay is commonly used for qualitative evaluation of polymeric materials and has been widely used as a standardized safety evaluation method in various nations. To quantitatively assess the cytotoxicity of the sample materials, the neutral red (NR) assay was combined with the MEM elution assay. The colony assay cytotoxicity testing method developed by Tsuchiya et al. is recognized as a sensitive, quantitative, and reproducible cytotoxicity testing method for medical devices.<sup>1</sup> The main feature of the colony assay is the use of a few cells in the test, testing

Received: February 11, 2008 / Accepted: July 24, 2008

B. Hexig · R. Nakaoka · T. Tsuchiya (✉)  
Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences,  
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan  
Tel. +81-3-3700-9196; Fax +81-3-3700-9196  
e-mail: tsuchiya@nihs.go.jp



the effect of biomaterials on the colony formation ability of the cells, and the testing period is 1 week. This method can obtain results similar to those of *in vivo* testing and can also predict the effect of prolonged *in vivo* use of biomaterials.<sup>11</sup> In contrast, the MEM elution assay in combination with the NR assay uses a great number of cells to test the effect of biomaterials on the survivability of cells, and the testing period is 24 h.

The cytotoxicities of the three hemostats and one adhesion barrier were assessed using these different testing methods, and the experimental results will be discussed comparatively. The main purpose of present study was not only detection of the cytotoxicity of each sample, but also investigation of the correlation between the cytotoxicity of biomaterials and clinical problems, and finding a definitive cytotoxicity testing methodology for biomaterials at the preclinical stage.

Furthermore, to predict the prolonged *in vivo* effect of these surgical materials on surrounding cells, tissues, or organs, the relationship between the degree of cytotoxicity and the extraction period used to prepare the sample for the assay was evaluated by the colony assay cytotoxicity testing method using V79 cells. The experimental results were compared with those of the standard reference materials evaluated by the same procedure.

## Materials and methods

Three kinds of locally absorbable hemostats [oxidized regeneration cellulose (Surgicel, gauze and cotton types), microfibrillar collagen (Avitene), and cotton-type collagen (Integran)] and one type of adhesion barrier [sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose membrane (Septrafilm)] were tested in this study. In addition, two kinds of segmented polyurethane films containing 0.1% zinc diethyldithiocarbamate (SRM-A) and 0.25% zinc dibutyldithiocarbamate (SRM-B) were used as positive standard reference materials, and a high-density polyethylene sheet (SRM-C) (thickness about 0.5 mm) was used as the negative standard reference materials for colony assay. All standard reference materials were kindly provided by Hatano Research Institute, Food and Drug Safety Center (Kanagawa, Japan).

## Sample preparation

The product names, and ingredients of the tested materials are summarized in Table 1. Several pieces of the sterile sample were placed in a sterilized tube and culture medium was added at a ratio of sample/medium of 6 cm<sup>2</sup>/ml.<sup>10</sup> Eagle's MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (10% FCS-MEM) (MEM, Gibco, Grand Island, NY, USA) was used for the MEM elution assay in combination with the NR assay, and Eagle's MEM supplemented with 5% FCS, nonessential amino acids, and 1 mmol/l sodium pyruvate (5% FCS-GMNP) was used for the colony assay method. After incubation at 37°C in a saturated humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air for 1 day, the extract solution designated as 100% extract was separated by centrifugation and decantation. The pH of the extract medium solution was measured and the detailed results of all samples are summarized in Table 1. The 100% extract was serially diluted with the corresponding medium to give 50%, 25%, 12.5%, and 6.25% extract solutions. Extracts showing acidity were neutralized with 1 M NaOH aqueous solution to a pH value of 7.4 and the neutralized extracts were also used in the assays.

## Cytotoxicity test

### MEM elution assay in combination with NR assay

In this study, the MEM elution was performed according to USP XXII(87) *Biological Reactivity Tests, in Vitro*. Murine fibroblast L929 cells were obtained from the Japanese Health Science Research Resources Bank (Osaka, Japan) and were grown in 10% FCS-MEM medium supplemented with nonessential amino acids at 37°C in a saturated humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air.

L929 cells ( $5 \times 10^4$ ) in 0.5 ml of 10% FCS-MEM were seeded in each well of a 24-well plate and incubated at 37°C in the saturated humidified atmosphere for 24 h. The medium was replaced with or without serially diluted extract. The cells were observed microscopically after 24-h exposure to the extract.

NR is a vital dye that is actively endocytosed within lysosomes of viable cells and provides an index of cell viability. After the MEM elution assay, the cytotoxicity of the

**Table 1.** Biomaterials utilized to assess cytotoxicity

Sample	Form	Material	Extraction conditions		
			Surface area/medium (cm <sup>2</sup> /ml)	Weight/medium (g/ml)	pH
Surgicel	Gauze type	Oxidized cellulose	6	0.021	2.9 ± 0.1
	Cotton type		6	0.079	2.8 ± 0.1
Avitene	Sheet	Microfibrillar collagen	6	0.09	4.2 ± 0.1
Integran	Sheet	Cotton type collagen	6	0.012	8.4 ± 0.1
Septrafilm	Sheet	Sodium hyaluronate and carboxymethylcellulose	6	0.029	6.8 ± 0.1
SRM-A	Sheet	Polyurethane (0.1% ZDEC)	6	0.12	7.2 ± 0.1
SRM-B	Sheet	Polyurethane (0.5% ZDBC)	6	0.12	7.2 ± 0.1
SRM-C	Sheet	Polyethylene	6	0.12	7.2 ± 0.1

SRM, standard reference material; ZDEC, zinc diethyldithiocarbamate; ZDBC, zinc dibutyldithiocarbamate

serially diluted extract on the L929 cells was quantitatively assessed by measuring uptake and accumulation of NR by the viable cells.

NR was dissolved in 10% FCS-MEM at a concentration of 50 µg/ml and the fine dye crystals were removed by centrifugation at 2000 ×g for 10 min. After observation of the MEM elution assay, the medium was replaced by 0.5 ml of medium containing NR and incubation was continued for 3 h at 37°C. After washing away the excess NR solution using phosphate buffered saline (PBS) (-) three times, the cells were fixed with 0.5 ml of 1% formalin and 1% CaCl<sub>2</sub> (v/v) and the dye was extracted by 0.5 ml/well of 1% acetic acid in 50% (v/v) ethanol solution. Absorbance of the obtained extract solution was recorded at 540 nm using a µQuant microplate reader (Bio-tek, Winooski, VT, USA).

### Colony assay

The colony assay using V79 cells followed the *Japanese Guidelines for Basic Biological Tests of Medical Materials and Devices-Part III: Cytotoxicity Test*. Chinese hamster fibroblast V79 cells were obtained from the Japanese Cancer Research Resources Bank (Tokyo, Japan) and were grown in Eagle's MEM supplemented with 10% FCS at 37°C in a saturated humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air. Several pieces of the sterile samples were placed in a sterilized tube and Eagle's MEM supplemented with 5% FCS, nonessential amino acids, and 1 mmol/l sodium pyruvate (5% FCS-GMNP) was added so that the sample/medium ratio was 6 cm<sup>2</sup>/ml. After incubation at 37°C in the humidified atmosphere for 1, 7, and 14 days, the extract, designated 100% extract, was separated by centrifugation and decantation.

A cell suspension (0.5 ml) with a concentration of 100 cell/ml was placed in each well of a 24-well plate and the plate was incubated for 4 h. Then, the medium was replaced with 0.5 ml of the serially diluted extract solution or the medium without extract (as a control), and the cells were cultured for 7 days. After the 7-day culture, the cells were fixed with methanol and stained with 5% Giemsa staining solution. The number of cell colonies in each well was counted, and the relative colony forming rate was calculated as the ratio of the number of cell colonies in the sample to that in the control. The cytotoxicity of the extracts was quantitatively expressed as IC<sub>50</sub> (%), which is the extract concentration corresponding to the colony forming rate of 50%.

### Data presentation and statistical analysis

The viability index for the NR method was calculated as follows: % sample viability = (A/B) × 100, where A is the optical density of cells cultured with an extract (sample) and B is the optical density of cells cultured without the extract (as control). All values were obtained from three or four sets of the same experiments and expressed as mean values ± SD. Differences among the groups were evaluated using

analysis of variance (ANOVA), and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

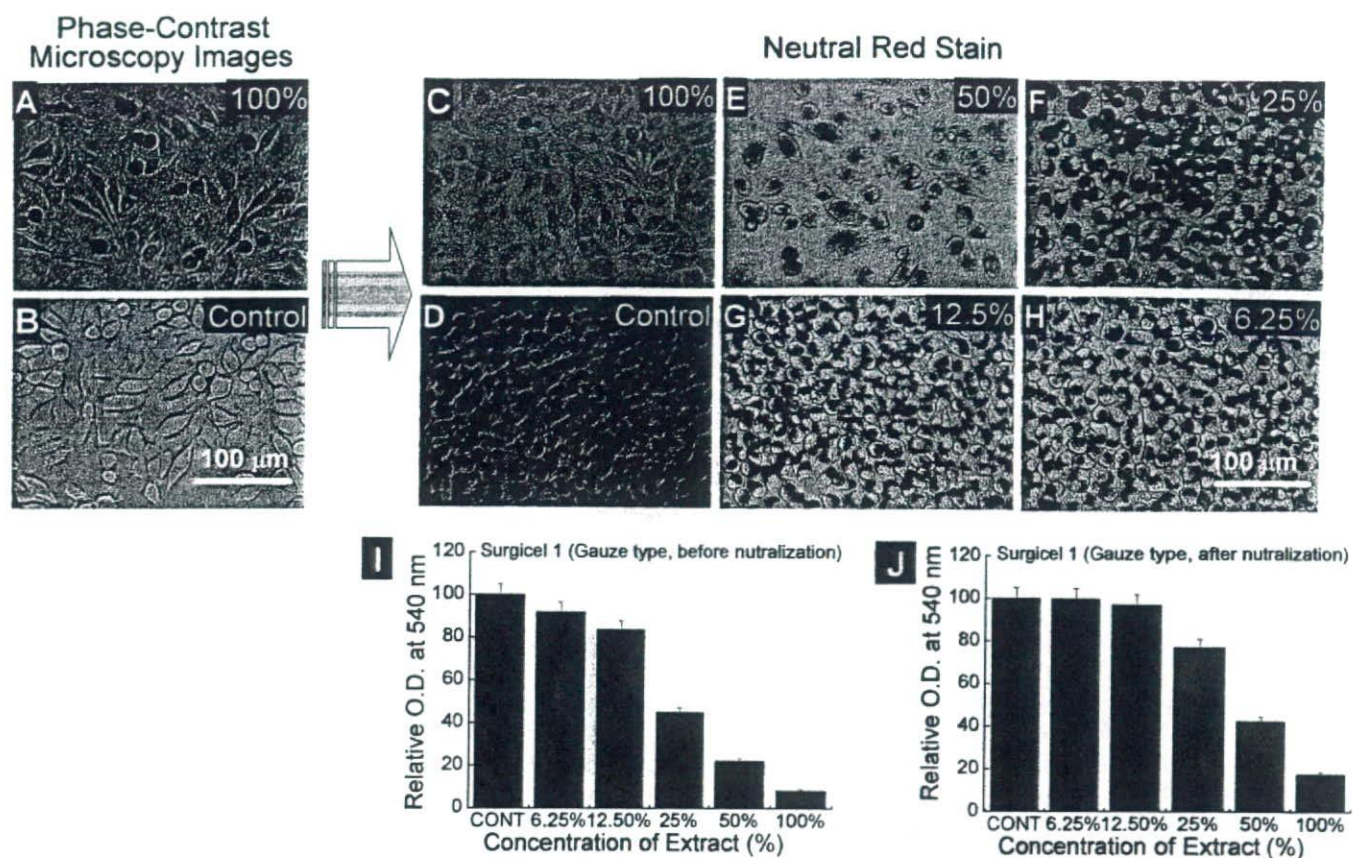
## Results

Figure 1 shows results of the MEM elution assay with and without (as a control) the extract from Surgicel (gauze type, Surgicel 1) (Fig. 1A,B) and quantitative assessment of Surgicel 1 by the MEM elution assay combined with the NR assay (Fig. 1C–J). As shown in Fig. 1A, more than 50% of the cells in the 100% extract of Surgicel 1 had a round shape. However, after staining with NR (Fig. 1C), all the cells were confirmed not to be viable, indicating that the MEM elution assay alone is not adequately sensitive and is unsatisfactory for the evaluation of biomaterials. In the control (Fig. 1D), all the cells were clearly stained with NR. For a 50% extract of Surgicel 1 (Fig. 1E), less than 20% of the cells were visible compared to the control, but almost all of the existing cells took up and accumulated the viability dye, NR. Overall, Fig. 1 clearly shows that the viable cell ratio increases with a decrease in the concentration of the extract both before and after neutralization. After neutralization, the viable cell ratio was higher compared to that for the same concentration of the extract solution before neutralization.

Figure 2 shows the relative colony forming rate of V79 cells cultured with various concentrations of extract solution of Surgicel 1 in the colony assay. The colony forming rate decreased with increasing extract concentration, and the colony formation of V79 cells was not observed when the concentration of the extract was greater than 25%. The calculated IC<sub>50</sub> value for Surgicel 1 was very low at an extract concentration of about 16.5%. Moreover, the cytotoxicity of Surgicel 1 extract solution was slightly reduced after neutralization, but the IC<sub>50</sub> was still very low at 18.5%.

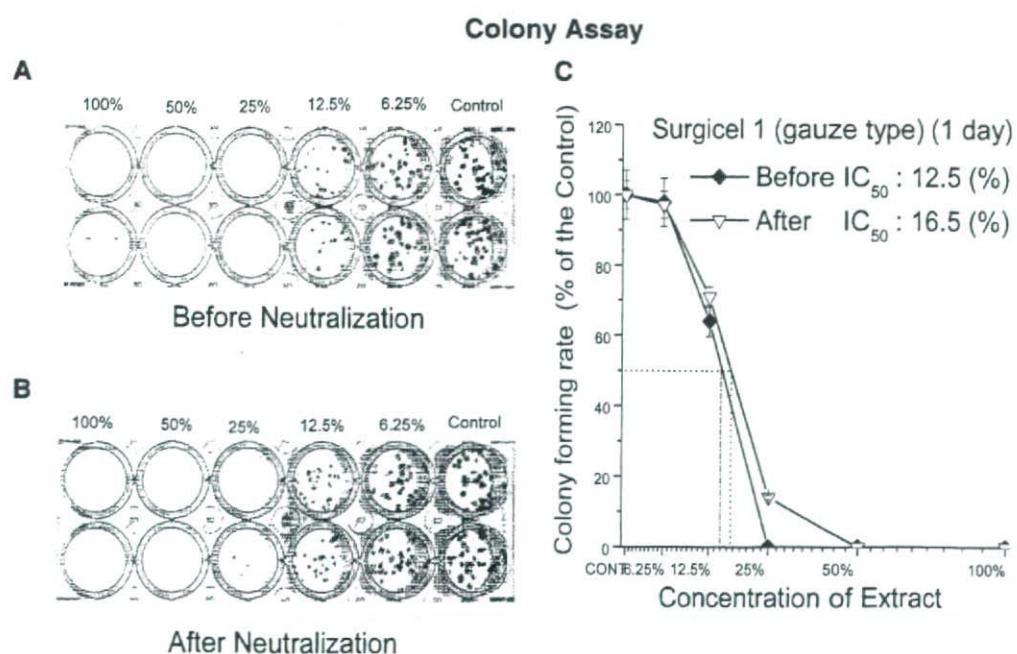
The cytotoxicity of cotton-type Surgicel (Surgicel 2) was also evaluated by the same testing methods. Figure 3 shows the results of the MEM elution assay combined with the NR assay for various concentrations of the Surgicel 2 extract. More than 50% and 70% of cells were round in the 100% extract and 50% extract solutions, respectively. After staining with NR, as clearly shown in Fig. 3A–F, only cells in extract solutions concentrations of less than 25% endocytosed and accumulated the NR dye. Figure 3G,H shows the corresponding cell viability indices (% of control) of the various concentrations of extract solution of Surgicel 2 before and after neutralization. To compare the morphology of dead and viable cells, Giemsa staining was performed after the NR assay. It was clearly shown that the dead cells had a much more angular shape than the viable cells.

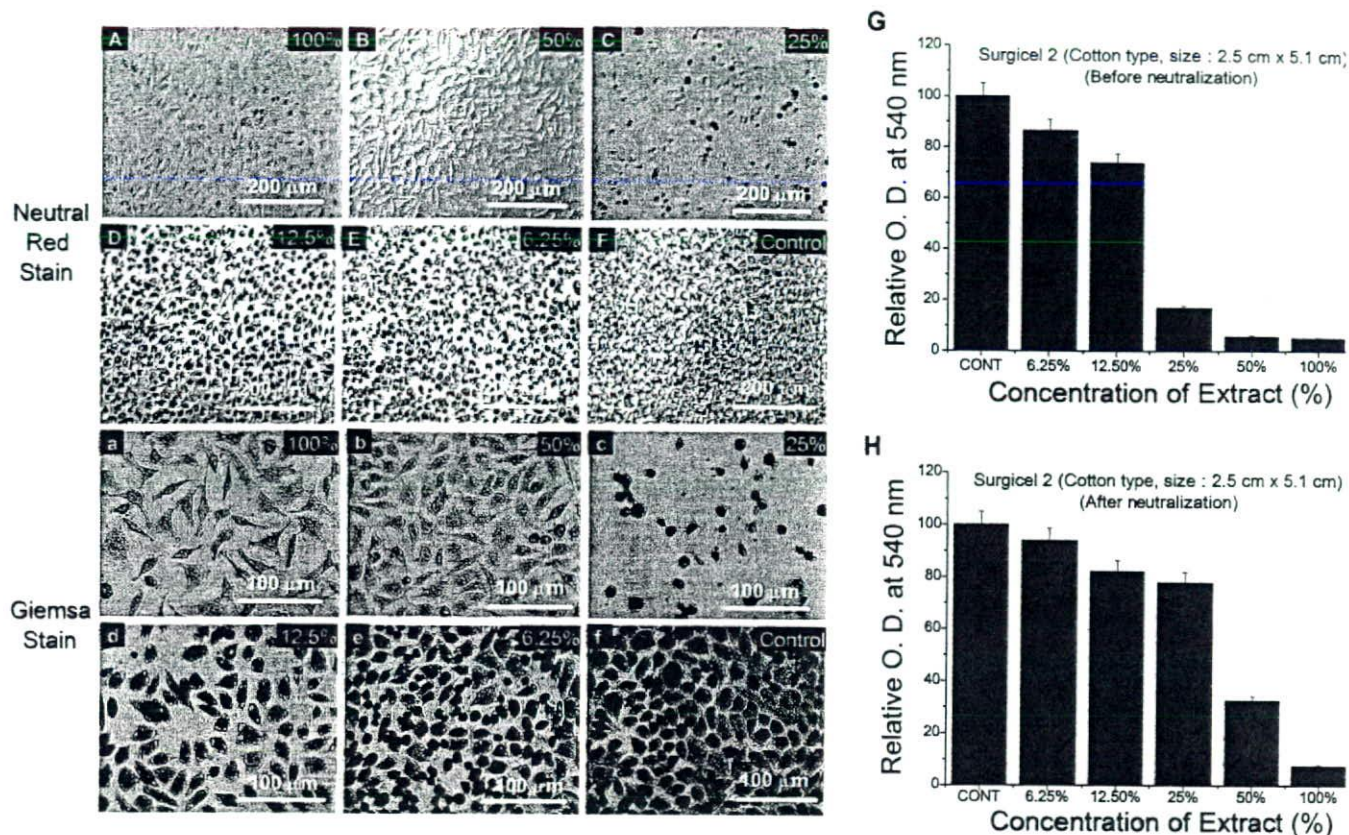
Figure 4 shows the results of the colony assay with various concentrations of the extract solution from Surgicel 2 before and after neutralization. The colony formation of V79 cells was not observed in extract solutions with concentrations above 25% and 50% before and after neutralization, respectively. The IC<sub>50</sub> of the extract before neutralization



**Fig. 1.** Observation of L929 cell morphology on culture with extracted medium of Surgicel 1 (gauze type) and after staining with neutral red (A–H), and the cell viability of L929 cells before (I) and after neutralization (J). A, 100% extract solution tested by MEM elution assay; B, control (without any extract solution); C, neutral red staining of 100% of extract solution; D, neutral red staining of control; E, 50% extract solution; F, 25% extract solution; G, 12.5% extract solution; H, 6.25% extract solution. O.D., optical density

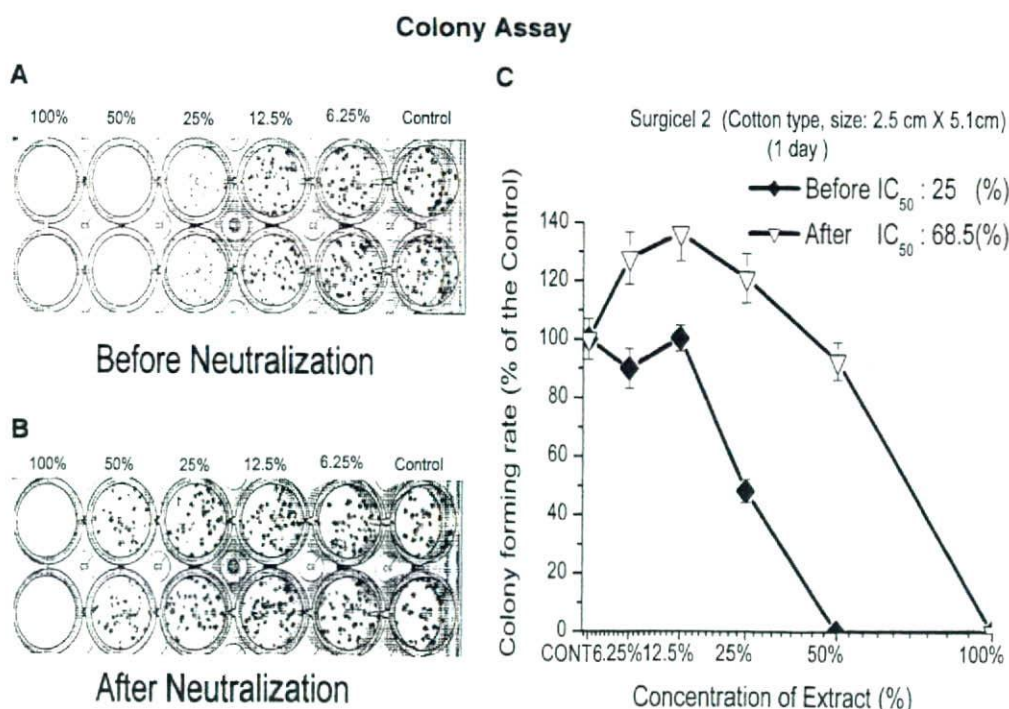
**Fig. 2.** Colony formation of V79 cells cultured with extract medium of Surgicel 1: A before and B after neutralization. C The plating efficiencies of V79 cells cultured with the extract of Surgicel 1 (before and after neutralization)





**Fig. 3.** Observation of L929 cell morphology on culture with extract medium of Surgicel 2 (cotton type) stained by neutral red (A–F) or Giemsa solution (a–f) and the cell viability of L929 cells before (G) and after neutralization (H). A and a, 100% extract solution; B and b, 50% extract solution; C and c, 25% extract solution; D and d, 12.5% extract solution; E and e, 6.25% extract solution; F and f, control (without extract solution)

**Fig. 4.** Colony formation of V79 cells cultured with extract medium of Surgicel 2: A before and B after neutralization. C The plating efficiencies of V79 cells cultured with the extract of Surgicel 2 (before and after neutralization)



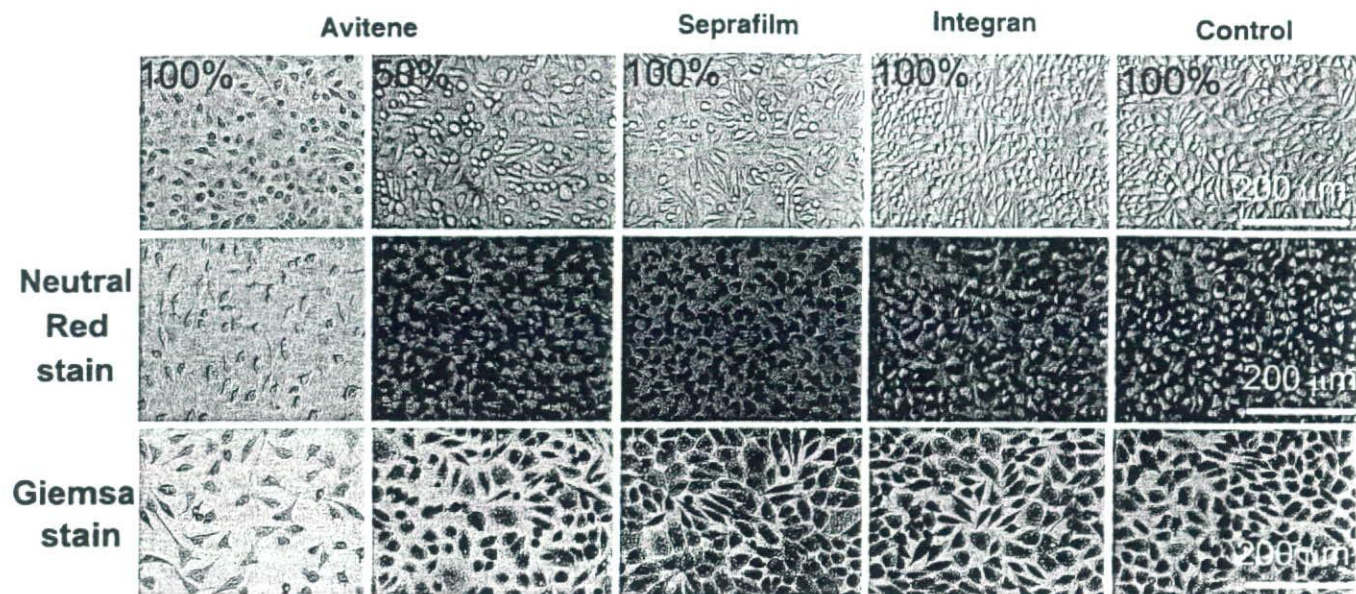


Fig. 5. Observation of L929 cell morphology of samples and control after staining with neutral red and Giemsa solution

was calculated to be 22.5%; however, after neutralization, it dramatically increased to the much higher value of 68.5%, indicating that the cytotoxicity of Surgicel 2 is strongly related to the acidic condition. In the extract solutions both before and after neutralization, the colony size decreased with increasing extract concentration.

The results of the MEM elution assay, NR assay, and Giemsa staining for 50% and 100% extract solutions of Avitene and 100% extract solutions of Seprafilm, Integran, and the control are shown in Fig. 5. Except for cells in the 100% extract solution of Avitene, all the rounded cells took up and accumulated NR dye. There was no significant difference between the viability of L929 cells cultured with medium extracts of Seprafilm, Integran, and the control, indicating that cytotoxicity was not detected for Seprafilm or Integran in the MEM elution assay. For Avitene, the viability of L929 cells cultured with a 50% extract solution also showed no significant difference with that of the L929 cells cultured with the control. The L929 cell viability cultured with various concentrations of extract solutions of Avitene, Seprafilm, and Integran are plotted in Fig. 6. The viability indices of L929 cells in the extract solutions of Avitene decreased steeply with increases in extract concentration when the extract concentration was above 50%, while no significant variation was observed for that of the L929 cells in the extract solutions of Seprafilm and Integran.

Figure 7 shows the results of the colony assay with various concentrations of extract solutions of Avitene, Seprafilm, and Integran. Moderate cytotoxicity was observed in the extract solutions of Seprafilm at concentrations above 25%, and a weak cytotoxicity was detected in the extract solutions of Avitene at concentrations above 50%. For Integran, the colony forming rate decreased gradually with increasing extract concentration, and the relatively high colony forming rate of 37.4% was obtained even at

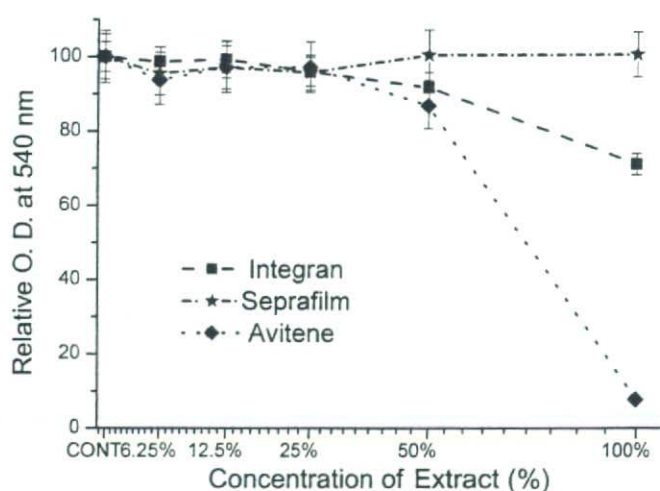
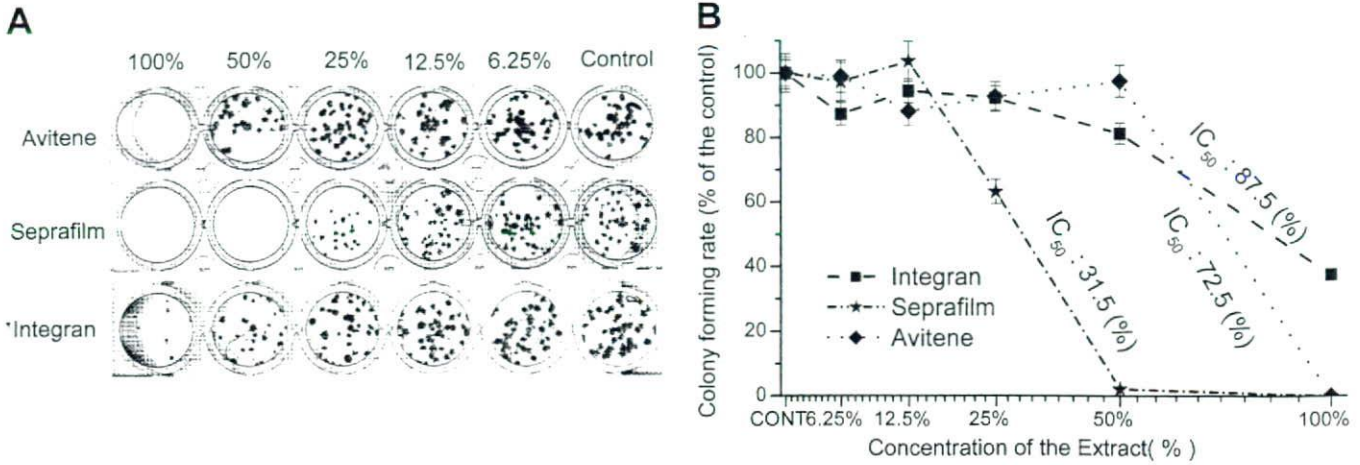


Fig. 6. Cell viability of L929 cells cultured with the extracts of Avitene, Seprafilm, and Integran

100% extract concentration. The  $IC_{50}$  of the extract solutions were calculated to be 72.5% for Avitene, 31.5% for Seprafilm, and 87.5% for Integran.

The results of the MEM elution assay and the colony assay for the 100% extract solutions of the materials are summarized and compared in the Table 2. Based on our results, the cytotoxicity of all tested materials was grade 2 or zero in the MEM elution assay. However, the NR assay indicated that only a few cells survived in the extract from Surgicel and Avitene. Furthermore, in the colony assay, colony formation (nearly 40%) was observed only in the 100% extract solution of Integran.

In this study, we also carried out cytotoxicity assessments of extract solutions of these biomaterials extracted for different periods by using the colony assay. The relationship between the cytotoxicities of the samples and the extraction



**Fig. 7. A** Colony formation of V79 cells cultured with the extracts of Avitene, Seprafilm, and Integran. **B** Plating efficiencies of V79 cells cultured with the extracts of Avitene, Seprafilm, and Integran

**Table 2.** Results of the MEM elution and the colony assays for 100% extracts of various surgical materials and the relationship between their cytotoxicities and extraction period

Sample	100% Extract (1 day)		Colony assay IC <sub>50</sub> (%)			Adverse effects	
	MEM elution assay		1 day	7 days	14 days		
	Grade of MEM elution assay	Relative O.D. at 540 nm (NR)	Colony forming rate (%)				
Surgical gauze	2 (pass)	5.12 (3) <sup>a</sup> (fail)	0	14.5	9.5	9.0	Inhibited bone regeneration
Surgical cotton	2 (pass)	5.36 (3) <sup>a</sup> (fail)	0	26.5	-	-	
Avitene	2 (pass)	7.74 (3) <sup>a</sup> (fail)	0	72.5	42.5	35	Abscess formation
Integran	0	71.4 (2) <sup>a</sup> (pass)	37.37	78.5	-	-	
Seprafilm	0	100	0	31.5	29	28	Foreign body reaction, inflammation reaction, and abscess formation
SRM-A	-	-	0	1.45	1.55	4.1	
SRM-B	-	-	0	36.5	34	33	
SRM-C	-	-	85.93	-	-	-	
ZDEC	-	-	0	0.25 (µg/ml)	0.75 (µg/ml)	>4 (µg/ml)	
Control	0	100	100	100	100	100	

MEM, minimum essential medium; O.D., optical density; NR, neutral red; IC<sub>50</sub>, extract concentration corresponding to a colony forming rate of 50%; -, not tested

<sup>a</sup>Numbers correspond to the grade of MEM elution assay by the NR assay method

period is summarized in Table 2. The IC<sub>50</sub> values obtained by the colony assay slowly decreased with increases in the extraction period up to 7 days for Surgicel 1, Avitene, and Seprafilm, indicating that the cytotoxicities of these materials increase with increases in the extraction period. Not much change was observed for the IC<sub>50</sub> values of SRM-A and SRM-B.

**Discussion**

In this study, the cytotoxicities of four kinds of widely utilized biomaterials were tested by the MEM elution assay in combination with the NR assay and a colony assay. The MEM elution assay in combination with the NR assay assesses the cytotoxicity of biomaterials through testing the survivability of a great number of cells in the extract solu-

tions of biomaterials. The colony assay assesses the cytotoxicity of biomaterials by testing the proliferation ability of a few cells in the extract solutions of biomaterials. The number of tested cells, cell behavior, and the testing periods are different between these cytotoxicity testing methods, so that they reveal different cytotoxic effects of biomaterials.

For Surgicel 1 and Surgicel 2, both methods revealed strong cytotoxicity, indicating that these absorbable hemostat materials not only affect the survivability, but also affect the proliferation ability of surrounding cells. For Avitene, both methods revealed weak cytotoxicity. Meanwhile, no cytotoxicity was detected for Integran in either method. In the MEM elution assay, no cytotoxicity was detected for Seprafilm; however, a moderate degree of cytotoxicity was observed in the colony assay, indicating that Seprafilm considerably affects the proliferation ability of surrounding cells, even though it does not affect the survivability of surrounding cells. The proliferation ability of cells

is more critical for the healing of surgical incisions, so this may reveal the reason for the adverse effects caused by Septrafilm.

Furthermore, the results of the MEM elution assay revealed that the cytotoxicity of Surgicel 2 is higher than that of Surgicel 1. However, the colony assay revealed that the cytotoxicity of Surgicel 1 is higher than that of Surgicel 2. Similar results were also observed for Avitene and Septrafilm. Septrafilm showed no cytotoxicity in the MEM elution assay, and Avitene showed the strongest cytotoxicity among Septrafilm, Avitene, and Integran. However, in the colony assay, much stronger cytotoxicity was observed for Septrafilm than for Avitene. These results suggest that there must be different mechanisms by which biomaterials affect the survivability and proliferation ability of cells. Therefore, we consider that for assessing the cytotoxicity of biomaterials, it is necessary to use a combination of two or more sensitive and quantitative methods to test the effect of biomaterials on both the survivability and proliferation ability of cells. Methods focusing on testing either the effects on the survivability of cells alone or testing the effects on the proliferation ability of cells alone are not adequate for completely revealing the cytotoxicity of biomaterials at the preclinical stage, which is critical for reducing the clinical risks.

In clinical use, absorbable hemostats and adhesion barriers are always utilized as plumb and are in contact with the surgical incision for a long time. The proliferation ability of cells is critical for the healing of surgical incisions, and in this respect, understanding the correlation between the extraction period and the degree of cytotoxicity of an absorbable hemostat or adhesion barrier through colony assays may provide a way to predict prolonged in vivo cytotoxic effects. Thus, the increasing cytotoxicity with increases in the extraction period observed in this study suggests that these surgical materials (Surgicel 1, Avitene, and Septrafilm) can affect the surrounding cells, tissues, or organs during long utilization after a surgical procedure. Based on a comprehensive understanding of the cytotoxic effects of each biomaterial, in clinically utilizing biomaterials, we consider it to be preferable to choose an appropriate material with a suitable utilization method according to the practical surgical conditions.

## Conclusion

The cytotoxicities of three kinds of commercially available absorbable hemostats and one adhesion barrier were assessed by two different cytotoxicity testing methods. The different testing methods detected different degrees of cytotoxicities for the materials studied. Cytotoxicity was

detected for Septrafilm in the colony assay, whereas no cytotoxicity was detected in the MEM elution test. To the best of our knowledge, this is the first report in which cytotoxicity has been detected for Septrafilm in vitro. We consider that the very low  $IC_{50}$  value in the colony assay may provide an answer to the clinical problems that can result from the use of Septrafilm. In conclusion, a combination of two or more sensitive and quantitative methods for safety evaluation is necessary to avoid false-negative results for biomaterials at the preclinical stage. We propose that investigation of the correlation between the cytotoxicity and extraction period may provide a way to predict the prolonged in vivo toxicity of absorbable biomaterials.

**Acknowledgments** This work was partially supported by Health and Labor Sciences Research Grants for Research on Advanced Medical Technology and Risk Analysis Research on Food and Pharmaceuticals from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan, as well as Health and Labor Sciences Research Grants for Research on Health Sciences Focusing on Drug Innovation by the Japan Health Sciences Foundation.

## References

1. Tsuchiya T, Ikarashi Y, Hata H, Toyoda K, Takahashi M, Uchida T, Tanaka N, Sasaki T, Nakamura A. Comparative studies of the toxicity of standard reference materials in various cytotoxicity tests and in vivo implantation tests. *J Appl Biomater* 1993;4:153-156
2. Kooten van TG, Klein LC, Wagner M, Kirkpatrick JC. Focal adhesion and assessment of cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 1999;46:33-43
3. Nappi JF, Lehman JA. The effect of Surgicel on bone formation. *Cleft Palate J* 1980;17:291-296
4. Ibarrola JL, Bjorenson JE, Austin BP, Gerstein H. Osseous reactions to three hemostatic agents. *J Endodont* 1985;11:75-83
5. Matthew IR, Browne RM, Frame JW, Millar BG. Subperiosteal behavior of alginate and cellulose wound dressing materials. *Biomaterials* 1995;16:75-78
6. Krishnan LK, Mohanty M, Umashankar PR, Lal AV. Comparative evaluation of absorbable hemostats: advantages of fibrin-based sheets. *Biomaterials* 2004;24:5557-5563
7. Dutton JJ, Tse DT, Anderson RL. Compressive optic neuropathy following use of intracranial oxidized cellulose hemostat. *Ophthalm Surg* 1983;14:487-490
8. Inoue M, Uchida K, Miki C, Kusunoki M. Efficacy of Septrafilm for reducing reoperative risk in pediatric patients undergoing abdominal surgery. *J Pediatr Surg* 2005;40:1301-1306
9. Tomizawa Y, Komori M, Takada K, Nishida H, Endo M, Kurosawa H. In vitro and in vivo evaluation of the biocompatibility and cytotoxicity of local hemostatic agents. *Jpn J Cardiovasc Surg* 2004;33:382-386
10. US Food and Drug Administration. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfMAUDE/search.cfm?searchoptions=1>
11. Tsuchiya T, Arai T, Ohhashi J, Imai K, Kokima H, Miyamoto S, Hata H, Ikarashi Y, Toyoda K, Takahashi M, Nakamura A. Rabbit eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities: in vivo/in vitro correlation study using standard reference materials. *J Biomed Mater Res* 1993;27:885-893

## 三次元スキャフォールドを用いた細胞培養系の評価方法の検討

迫田秀行<sup>#</sup>・中岡竜介・松岡厚子・土屋利江

## Study of evaluation methods for cell culture system using three-dimensional scaffolds

Hideyuki Sakoda<sup>#</sup>, Ryusuke Nakaoka, Atsuko Matsuoka and Toshie Tsuchiya

In tissue engineering and related studies, *in vitro* evaluations are often carried out by a three-dimensional cell culture, where cells are inoculated in three-dimensional scaffolds. Cell number is one of the most fundamental parameters in cell cultures and especially important in three-dimensional cell cultures because cell behavior is sometimes dependent on the cell density. However, there are many studies where cell number is not specified, probably due to the difficulty of evaluating cell number in the three-dimensional cell culture.

In this study, we examined if existing methods to evaluate cell number established for conventional two-dimensional cell cultures could be applied to the three-dimensional cell cultures using collagen composite scaffolds and human articular chondrocytes as an example of the three-dimensional cell culture. The cells were inoculated on the conventional cell culture plate or the scaffolds and the cell number was estimated by different methods and the results were compared with each other. Firstly, DNA quantification method was shown to be able to estimate cell numbers in either two-dimensional or three-dimensional culture. Secondly, the results of non-destructive cell number estimation method using alamarBlue reagent were found to be consistent with those of DNA quantification method in either two-dimensional or three-dimensional culture. However, the results of the other non-destructive cell number estimation method using TetraColor ONE reagent were not consistent with those of other methods in the three-dimensional culture.

It was concluded that when applying existing evaluating methods established for the two-dimensional cell cultures to a three-dimensional cell culture, it is important to validate them for the three-dimensional cell culture.

Keywords: three-dimensional cell culture, scaffold, tissue engineering, cell number

## 1. 緒言

再生医療やそれに関する研究では、細胞を医用材料で立体的に構築された三次元スキャフォールドに播種し、培養を行うことが多い。このような三次元培養系の培養方法や評価方法は、二次元培養系において確立されたものの応用であることが多いが、三次元培養系には以下に示すような、二次元培養系にない特有の問題があり、それらの評価方法への影響について検討する必要がある。

例えば、二次元培養系では一般的に細胞の生着率は高

いため、単純に細胞播種の時の細胞数から培養開始時に生存している細胞数の推定や制御が可能である。しかし、三次元培養系では、スキャフォールドの種類や播種の方法、使用する細胞数により生着率が大きく異なる<sup>1-4)</sup>ため、培養開始時であっても生存細胞数を推定することが難しい。にもかかわらず、細胞培養系において最も基本的なパラメータである細胞数を評価する際に、このことを十分に考慮していない文献が散見される。

また、細胞の分布について考察する必要があるのも三次元培養系の特徴である。二次元培養系では、多くの実験系において細胞が二次元的に均一に分布していることが前提となっている。一方、三次元培養系では、その分布が三次元的になるだけでなく、スキャフォールドの種類や播種の方法により、播種したスキャフォールドの表

To whom correspondence should be addressed:

Hideyuki Sakoda: Kamiyoga 1-18-1, Setagaya, Tokyo

158-8501, Japan; Tel: 03-3700-9264;

Fax: 03-3700-1478; Email: sakoda@nihs.go.jp



面付近に細胞が集中するなど、必ずしも均一に分布させることができない。三次元培養系における細胞の増殖や分化といった応答は、スキャフォールドの材質やデザイン、成長因子などはもちろん、細胞密度などにも影響される<sup>5)</sup>ことが知られており、細胞数や細胞分布の評価は、三次元培養系では特に重要となってくる。

これらのパラメータの評価には、前述のように二次元細胞培養系において確立された方法を応用することになるが、スキャフォールドの存在のために適用が困難なものもあるため、そのスキャフォールドの評価系への影響についてあらかじめ考察しておく必要がある。特に、親水性のゲル状やスポンジ状のスキャフォールドでは、その内部に含まれる溶液を完全に除去することが困難であるため、様々な評価系においてその溶液の存在が問題になることが考えられる。

本研究では、三次元培養系における適切な細胞数の評価方法の検討と、スキャフォールドによる影響について、ヒト正常軟骨細胞と三次元コラーゲンスキャフォールドを使用し考察を行った。さらに、その応用例として、三次元コラーゲンスキャフォールド中で培養した軟骨細胞の増殖についても検討を行った。

## 2. 材料および方法

### 2-1 材料

本研究では、ヒト正常軟骨細胞 (Lonza Walkersville, Walkersville, MD, USA)、軟骨細胞用培地 (Lonza)、三次元コラーゲン複合体スキャフォールド (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) をそれぞれ購入して使用した。スキャフォールドは孔径がおよそ100  $\mu\text{m}$  から200  $\mu\text{m}$  のスポンジ状で、直径約5 mm、高さ約4 mmの円柱状であった。このスキャフォールドに培地を滴下すると、およそ50  $\mu\text{L}$  の培地を保持した。

### 2-2 DNA量からの細胞数推定の検証

所定の細胞密度の細胞懸濁液を、スキャフォールドが保持できる培地量である50  $\mu\text{L}$  滴下したスキャフォールドを試料とした。

DNA量の測定は直接法とコラーゲナーゼ法の二つの方法で行った。直接法では、試料に界面活性剤 (0.2 %, Triton X-100, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を加えたTE緩衝液 (10 mmol/L トリスヒドロキシメチルアミノメタン, 1 mmol/L エチレンジアミン四酢酸, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を1 mL 添加し、超音波処理により細胞を破壊した。この溶液100  $\mu\text{L}$  にDNAと結合する蛍光試薬 (PicoGreen, Invitrogen) を加え、その蛍光強度からDNA量を決定した。コラーゲナーゼ法では、まずハンクス液 (日水製薬, 東京) にコラーゲナーゼ

A (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany) を0.1% 加えた溶液を試料に500  $\mu\text{L}$  加え、37°C で1時間振とうすることで、スキャフォールドを分解した。次に、0.4% の界面活性剤溶液を500  $\mu\text{L}$  加え、直接法と同様の測定を行った。

### 2-3 細胞の播種及び細胞分布の観察

スキャフォールドには、滴下法と遠心法の二種類の 방법으로細胞を播種した。滴下法では、50  $\mu\text{L}$  の培地に1~8  $\times 10^4$  の細胞が含まれるよう調製し、マイクロピペットでスキャフォールドの上にゆっくりと滴下して播種した。遠心法では、15 mL のプラスチック遠心管に約1  $\times 10^7$  の細胞を含む細胞懸濁液10 mL とスキャフォールドを入れ、180  $\times g$  で2分遠心した<sup>4)</sup>。遠心後は懸濁液をよく攪拌して遠心を再度行い、合計4回遠心を行って細胞を播種した。

細胞分布はcalcein-AMとethidium homodimer-1からなる蛍光色素 (Live/Dead Kit, Invitrogen) により評価した。calcein-AMは、細胞内に取り込まれ、エステラーゼにより強い緑色の蛍光を発するcalceinに加水分解される。Calceinは細胞膜を透過しないため、結果的に生細胞のみが緑色に染色される。これに対しethidium homodimer-1は、細胞膜損傷部から進入して核酸と結合するため、死細胞のみが強い赤色の蛍光を発する。細胞を播種したスキャフォールドを所定時間培養した後、1.6  $\mu\text{mol/L}$  の calcein-AM と 4  $\mu\text{mol/L}$  の ethidium homodimer-1を含む培地で10分程度培養し、スキャフォールド表面の観察を行った。その後、スキャフォールドをメスで切断し、断面を観察した。

なお、対照の二次元培養では5~80  $\times 10^3$  /wellの細胞を24ウェルプレートに播種し、同様の検討を行った。

### 2-4 非破壊的方法による細胞数評価

二次元及び三次元で播種した細胞を一晩培養した後、非破壊な方法による細胞数評価を行った。具体的には、細胞の活性により化学変化して生じる蛍光、あるいは吸光により細胞数の測定が可能となる、TetraColor ONE (生化学工業, 東京) 及びalamarBlue (Invitrogen) の二種類の試薬を使用した。これらは、細胞毒性が低いため、測定後も培地交換することにより継続して培養が可能であり、三次元培養系に適用できればその有用性は高い。ただし、細胞あたりの活性が一定であることを前提として細胞数を推定するものであり、間接的な評価方法といえる。

ここでは、二次元及び三次元で播種した細胞を一晩培養した後、培地をそれぞれの試薬を10%含むものに交換し、2または6時間培養後に蛍光強度あるいは吸光度を

測定した。

非破壊的方法で評価を終えた試料についても、前述の方法でDNA量の測定を行った。予め作成した検量線を用いてDNA量から換算した細胞数と非破壊的方法で推定された細胞数とを比較検討し、非破壊的方法による細胞数評価の妥当性を評価した。

### 2-5 三次元培養における細胞増殖の非破壊的評価

滴下法および遠心法でスキャフォールドに播種した細胞の増殖をamarBlueで評価した。滴下法では $8 \times 10^4$ の細胞を含む細胞懸濁液50  $\mu$ Lを滴下して播種した。比較のため二次元培養についても同様の実験を行った。二次元培養では $1 \sim 8 \times 10^4$ /wellの細胞を24ウェルプレートに播種した。それぞれ播種後1, 4, 7, 14日目の細胞数をamarBlueにより経時的に評価した。

### 2-6 混入物によるDNA量測定への影響

DNA量測定の際に混入する可能性のある物質による測定への影響について検討を行った。TE緩衝液に培地およびコラーゲン分解物をそれぞれ10%添加したものを試料とした。また、超音波処理により発生したスキャフォールド断片、液体コラーゲン (3 mg/mL, 新田ゼラチン, 大阪市), 0.1%コラゲナーゼ液についても調べた。これらの試料に蛍光試薬 (PicoGreen) を加え、DNA量測定と同様に蛍光強度を測定した。

### 2-7 試薬の溶出速度の予備検討

スキャフォールド内部における拡散速度が測定に影響を与える可能性が考えられたため、TetraColor ONEとamarBlueのスキャフォールドからの溶出速度について予備検討を行った。具体的には、還元状態にしたそれぞれの試薬に浸漬しておいたスキャフォールドを新しい培地に移し、培地の吸光度あるいは蛍光強度を経時的に測定した。

## 3. 結果

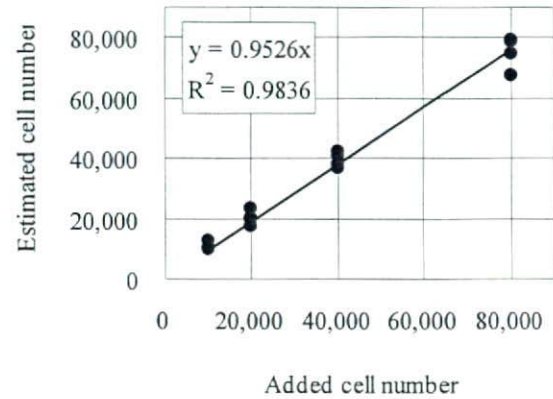
### 3-1 DNA量からの細胞数推定の検証

今回使用したコラーゲンスキャフォールドは、一度培地を含むと培地を除去することが困難であった。そのため、細胞懸濁液のみの場合も含め、50  $\mu$ Lの培地を含んだ状態で測定を行った。

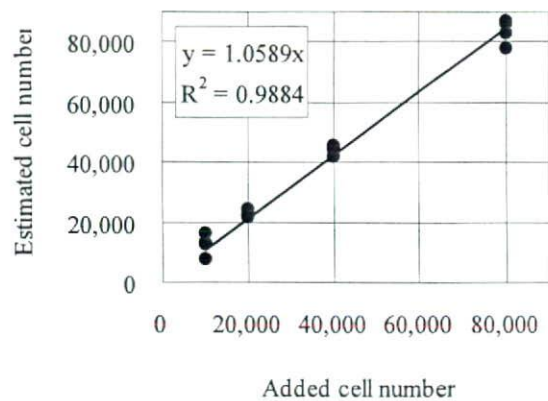
細胞懸濁液のみの場合、細胞数とDNA量の間に明瞭な相関が認められた (図示していない) ので、これ以降はこの関係を用いてDNA量を細胞数に換算した。

Fig. 1に細胞懸濁液とスキャフォールドの混合物について、直接法、コラゲナーゼ法でDNA量を測定した結果を示す。いずれの方法でも、混合物に添加した細胞数

と、DNA量から推定された細胞数がほぼ一致し、DNAや試薬のコラーゲンへの吸着などの影響はないと判断できたため、以後の測定は直接法のみで行った。



(a) Direct method



(b) Collagenase method

Fig. 1 Relationship between added cell numbers and estimated cell numbers in mixtures of cells and scaffolds by DNA quantification

### 3-2 細胞播種法の違いによる細胞分布の検証

Fig. 2およびFig. 3に二次元培養、滴下法による三次元培養、遠心法による三次元培養における細胞分布を示す。二次元培養では生細胞 (緑色) が多くみられ (Fig. 2 a), 死細胞 (赤色) は観察されなかった (Fig. 3 a)。滴下法ではスキャフォールド表面に多くの生細胞が観察された (Fig. 2 b) が、断面では生細胞は観察されなかった (Fig. 2 d)。この時、赤色蛍光も観察された (Fig. 3 b) が、細胞を含まないスキャフォールドでも同程度の赤色蛍光が観察された (Fig. 3 c) ため、この蛍光はスキャフォールド由来のものと考えられた。遠心法ではスキャフォールド表面 (Fig. 2 c) だけでなく、断面にも生細胞が観察され (Fig. 2 e)、内部にも細胞が入

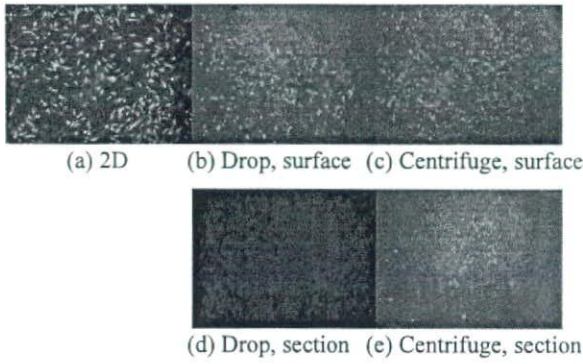


Fig. 2 Cell distribution in (a) two-dimensional culture ( $\times 100$ ) and (b)-(e) three-dimensional culture ( $\times 40$ )



Fig. 3 Distribution of red fluorescence (dead cell marker) in (a) two-dimensional culture, (b) three-dimensional culture and (c) scaffold only ( $\times 100$ )

り込むことがわかった。死細胞については滴下法の場合と同様の像（図示していない）が観察された。

### 3-3 細胞数評価

二次元培養の場合は、非破壊的細胞数評価法の試薬の呈色量もDNA量とよく比例する（図示していない）ことがわかった。そこで、この比例関係を用いて試薬の呈色量から細胞数への換算を行った。Fig. 4に二次元培養及び三次元培養の細胞数の測定結果を示す。横軸はDNA量測定から換算した細胞数を、縦軸は試薬の呈色量から求められた細胞数である。

TetraColor ONEを使用した場合、三次元培養では二次元培養に比べ呈色量が減少し、その結果、DNA量測定から推定された細胞数に比べ細胞数が少なく推定されることが示された。この傾向は培養時間を長くしても変わらなかった。これに対し、alarmarBlueを使用した場合は、三次元培養でも二次元培養と同程度の蛍光強度を示し、DNA量測定から推定された細胞数とほぼ一致することが示された。また、培養時間の影響、さらには、三次元培養における播種方法の違いによる影響はほ

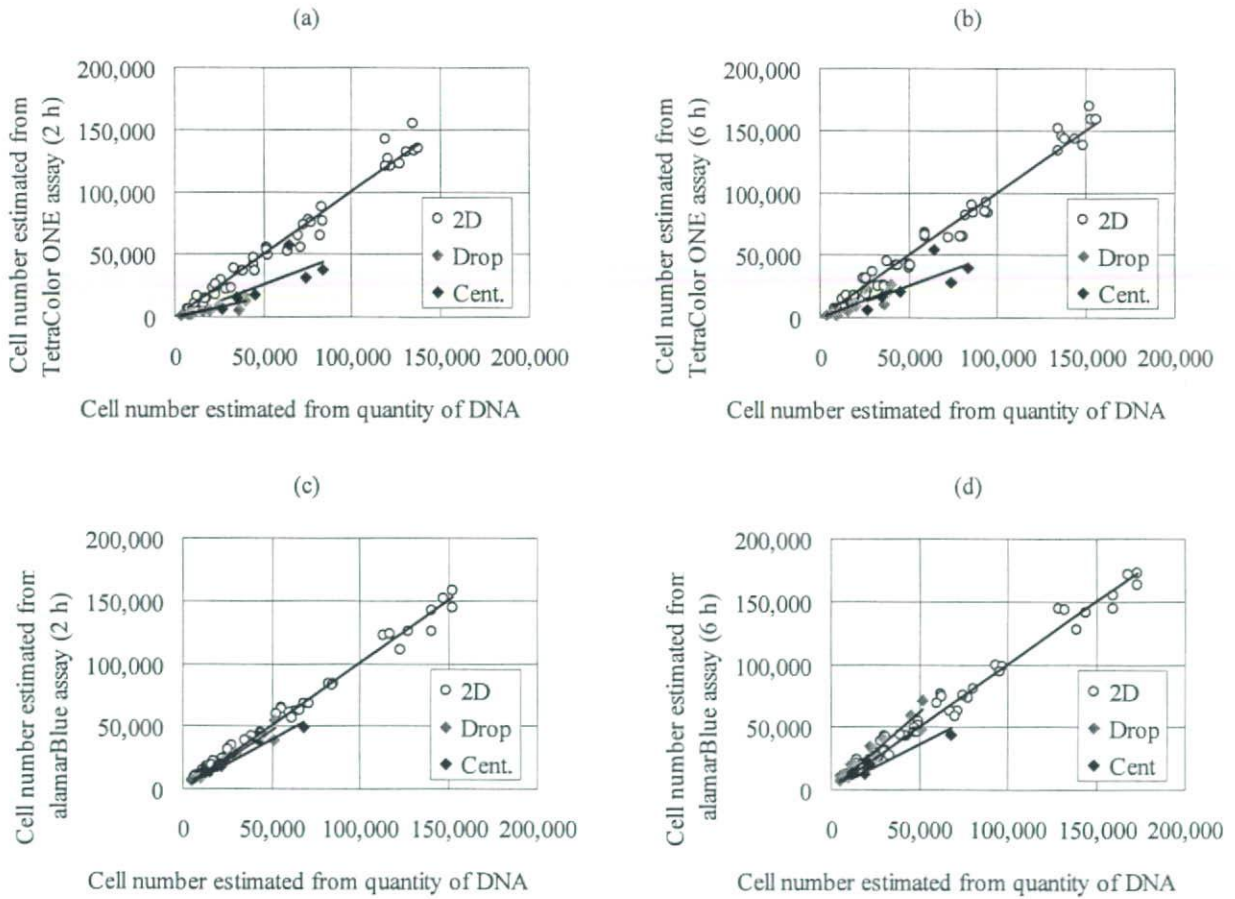


Fig. 4 Relationship between estimated cell numbers from non-destructive methods (TetraColor ONE assay and alamarBlue assay) and those from the measurements of quantity of DNA

とんど見られなかった。

### 3-4 三次元培養における細胞増殖の非破壊的評価

Fig. 5に三次元培養における細胞増殖を経時的に評価した結果を示す。二次元培養では細胞数が急速に増加し、播種に用いた細胞数にもよるが7日目以降より細胞が培養容器をほぼ完全に覆って増殖が停止した状態（コンフルエント）になることがわかった。それに対して三次元培養では、培養初期から後期までほとんど細胞数が変化しないことがわかった。

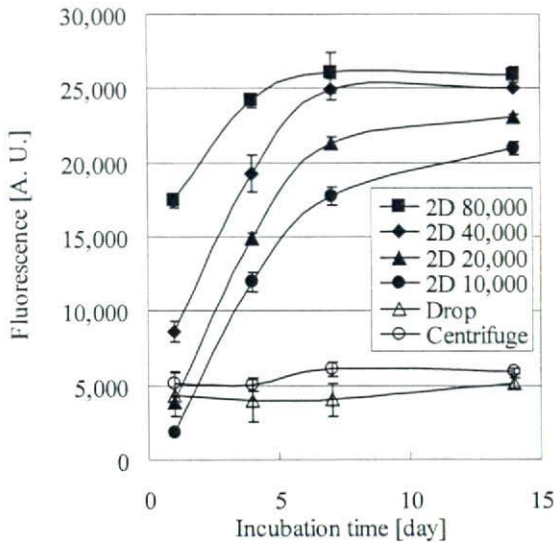


Fig. 5 Cell proliferation in 2D-culture (added cell numbers: 1, 2, 4,  $8 \times 10^4$ ) and 3D-culture ( $n = 3-4$ ).

### 3-5 混入物によるDNA量測定への影響

培地とコラーゲン分解物はそれぞれ10%の混入で細胞数600と3,000に相当する蛍光を示した。また、スキャフォールド断片、液体コラーゲン、0.1%コラーゲナーゼ液は、それぞれ細胞数10,000程度に相当する蛍光を示すことがわかった。

### 3-6 試薬の溶出速度の予備検討

Fig. 6に試薬の溶出速度の測定結果を示す。平衡に達するまでの時間は、TetraColor ONEでは、約30分であったのに対し、alamarBlueでは約10分であった。

## 4. 考察

DNA量から細胞数を推定する方法は、細胞を破壊する必要があり、同一試料による経時的な測定ができないという短所があるが、細胞数を直接的に評価できるため、第一の選択肢として検討を行った。

今回使用したスキャフォールドは、培地と接触すると

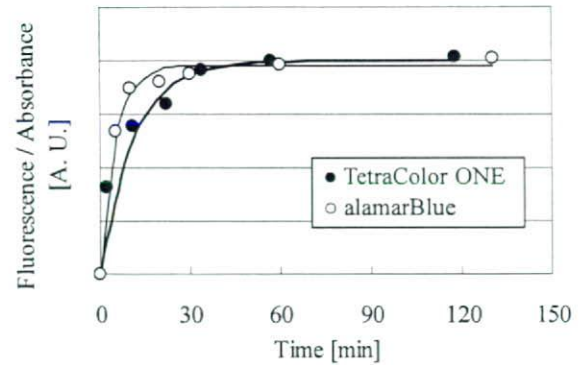


Fig. 6 Elution of the reduced forms of TetraColor ONE and alamarBlue from the scaffolds ( $n = 1$ )

数秒から十数秒で培地を吸収し、保持した。呈色試薬を使用した場合は、測定後に培地交換を行ってもスキャフォールドは呈色したままであり、試薬の除去はできなかった。このようにスキャフォールドの種類によっては洗浄が困難であり、例えば、DNA量を測定する場合でも培地の混入が避けられないため、これを想定した取り扱いが必要である。混入の可能性のある、培地、スキャフォールド断片、コラーゲン分解物、コラーゲナーゼ液は、いずれも蛍光試薬を使用したDNA量測定の際に蛍光を示すことがわかった。これらの影響は、いずれも適切な対照試料を設定することにより相殺することが可能であるが、試験試料中に含まれる細胞数が少ない場合は、大きな誤差の要因になることが示唆された。実際、Fig. 4では、このような混入物による影響を対照試料により相殺しているが、特に低細胞数の領域でばらつきが多かったのは、このことが影響していると思われる。また、ethidium homodimer-1によりスキャフォールドに死細胞の存在を意味する赤色蛍光が観察されたことは、三次元培養系特有の影響が出た一例であり、改めて三次元培養系における各種評価系の事前の検討の重要性を示している。

一方、三次元スキャフォールドへの効率的な細胞播種方法の開発も重要な課題である。これまで、遠心によるもの<sup>1)</sup>、真空を用いるもの<sup>2)</sup>、スピナーフラスコによるもの<sup>3)</sup>などが提案されている。真空を用いる方法<sup>2)</sup>についても検討を行ったが、今回使用したスキャフォールドでは細胞が播種できなかったため本研究では採用しなかった。そこで滴下法と遠心法についてのみ検討を行ったが、今回使用した条件では、初期の播種密度が低く、細胞の増殖も見られないことから、健全な軟骨組織の再生は難しいと考えられた。播種後の最適な細胞分布については不明なことも多いが、スキャフォールド内部の細胞数や細胞分布を確認しながら、スキャフォールドの材質、デザイン及び播種方法を工夫することで、細胞分布