

FACSCalibur (Becton Dickinson)での解析の直前に Propidium iodide (PI、0.625ug/mL)を入れて、PI 染色による生細胞数の測定をした。生存細胞の総数が 5,000 個になるまで測定し、生存率を求めた。

CV75 (生存率 75%) の算出

濃度設定試験の結果から、生存率 75%の前後の生存率を占める2濃度から下記の計算式により CV75 を計算した。

$$\text{LogCV75} = (75-c) \times \text{Log}_{10}b - (75-a) \times \text{Log}_{10}d / a-c$$

a, b, c, d は図 1 を参照

b) 本試験

CV75 が 277.5ng/ml であることが算出されたことから、277.5ng/ml を基準に、高濃度側に 1 濃度、低濃度側に 6 濃度公比 1.2 で試験濃度を設定した。stock solution および working solution は濃度設定試験時と同様に調製した。THP-1 細胞は 24 well プレートに 2×10^6 cells/ml を 500ul/well で播種し各濃度希釈系列の working solution の 500ul を添加し、CO² incubator で 24 時間培養した。

培養後は 1.5ml チューブに移し、700 × g で 3 分遠心して細胞を回収した後、FACS buffer (PBS+0.1%BSA) に懸濁して 2 回洗浄し 700 × g で 3 分遠心して細胞を回収した。遠心後の細胞を PBS で 0.01% に調製したヒトγグロブリン溶液 (Sigma-Aldrich, G2388) 600 μl に懸濁し、4℃で 15 分間ブロッキングした。反応終了後、180 μl ずつ 96well

プレートに移して三分割し、700 × g で 3 分間遠心して上清を捨てた。回収した細胞を適切な濃度の anti-human CD86 antibody (BD pharmigen: 555657), anti-human CD54 antibody (DAKO: F7143), Mouse IgG1 (DAKO: X0927) をそれぞれ別の well に添加し、4℃で 30 分間遮光状態で静置した。FACS buffer を用いて 3 回洗浄後、400ul の FACS buffer に細胞を懸濁し、細胞の表面抗原の発現レベルを DB FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて測定した。死細胞は PI によって染め分け、生存細胞の総数が 10,000 個になるまで測定した。CD86 および CD54 発現の評価方法として、以下の式に基づいた相対蛍光強度 {Relative fluorescence intensity (RFI)} を用いた。

RFI(%)=	添加剤処理細胞の MFI - 添加剤処理細胞の isotype control の MFI	× 100
	Control(溶媒)の MFI - Control(溶媒)isotype control の MFI	

*MFI = (geometric) mean fluorescence intensity.

陽性基準は CD86 RFI=150, CD54 RFI=200 のいずれか一方を超えたものを陽性と判定する。

2: LLNA

動物

動物実験は OECD test guideline に従っ

て動物を維持及び管理した。7-10 週齢の CBA/JNCrlj female mice は Charles River Laboratories (Yokohama, Japan) から購入した。マウスは 1 ケージに 4 匹で飼育し、1 週間の馴化後実験に使用した。

媒体

アセトンとオリーブ油を 4:1 の比率で混ぜた溶液を媒体として用いた。

陰性対照群 (媒体対照群)、試験物質群 (1 ug/ml, 10 ug/ml, 100ug/ml, 1 mg/ml, 10 mg/ml : 5 用量)、陽性対照群 (0.5% (W/V) 2,4-Dinitrochlorobenzene (DNCB)) を一セットとして実験を行った。陰性対照、試験物質、陽性対照をそれぞれ 25 μ l ずつマウスの両耳介に 1, 2, 3 日目に連続で塗布した。6 日目に 0.5ml の BrdU を腹腔内投与し、7 日目にマウスを安楽死させ、local lymph node cells (LCs) を摘出した。各マウスの LCs は個別に 40mM nylon cell strainer (BD Falcon, Billerica, MA, USA) を用いて細胞を懸濁し、15ml の PBS に再浮遊させ、その 100 μ l を使用して BrdU ELISA kit (chemiluminescence, Roche, Indianapolis, IN, USA) を用いて BrdU の取り込み量を測定した。

C. 研究結果

h-CLAT

a) 濃度設定試験

濃度設定試験を行うにあたり、V79 コ

ロニーアッセイにおいて、塩化トリブチルスズの IC50 が 10- 50 ng/ml の範囲であったので、濃度設定試験の最高濃度を 1ug/ml とし、その濃度から公比 2 で 8 濃度希釈系列で試験を行った。

(図 1) その結果、生存率 75% の前後の生存率を占める 2 濃度が 250ng/ml (生存率 82%) と 500ng/ml (生存率 35%) であったことから、CV75 を求める計算式に代入し、CV75 が 277.5ng/ml であることが算出された。そこで本試験では 277.5ng/ml を基準に、高濃度側に 1 濃度、低濃度側に 6 濃度公比 1.2 で試験濃度を設定することにした。

b) 本試験

濃度設定試験で設定した濃度で本試験を行った。(図 2, 3) 細胞の生存率はコントロールで 90% 以上かつ陽性対照である DNCB が 60% 以上を満たし、さらに DNCB が CD86 及び CD54 が共に陽性基準を超えて陽性であったことからこの試験が成立していることが確認された。そこで試験物質である塩化トリブチルスズでの細胞生存率をみたところ、濃度依存的に低下していたが、最高濃度(333 ng/ml)でも 50% 以上ではあったので、試験濃度のすべてのデータを採用できた。一方、CD86 と CD54 の発現においては、試験したすべての濃度で CD86 の RFI が 30 前後であったのに対して、CD54 は最低濃度 (93ng/ml) から陽性基準である RFI=200 を超えており、さらに CV75 である 277.5ng/ml まで、濃度依

存的に増強していた。

LLNA

陽性対照のDNCBがh-CLATの約1000倍の濃度であることから、試験に用いる塩化トリブチルスズの濃度をh-CLATで陽性判定だった最低濃度の100ng/mlの1000倍を基準にして高濃度側に2濃度、低濃度側に2濃度公比10で設定した。その結果、高濃度側で濃度依存的にリンパ球の活性化が上がっていることが分かった。(図4) In vivo LLNA-BrdU法の場合、陰性対照群に対する試験物質投与群の平均値の比をStimulation index (SI)で表し、 $SI \geq 3$ を感差性陽性と判断するが、最高濃度の10 mg/mlで $SI = 7$ (307092 vs 43378) あった。

D. 考察

今年度は医用材料として使用されている生分解性ポリマーの合成時に触媒として使用されるジブチルスズの不純物として含有される可能性があり、かつTリンパ球での解析からアレルギー性を有するとの報告もあるトリブチルスズのアレルギー性の評価をh-CLATで行うことが可能であるかを検討した。その結果、設定した試験濃度の最低濃度である(93ng/ml) からCD54のRFIが陽性基準の200を超えていた。一方、CD86のRFIは低濃度から高濃度まで30前後と変化がみられなかった。この結果は昨年度までに報告したポリマー自身のh-CLATの結

果と酷似している。しかしながら、ポリマーでの結果が混在トリブチルスズの影響であるのか、もしくは全く別の原因に由来するのか、現在のところは不明である。またこれまでの報告にもCD54のみ陽性基準を超える物質があるが、そのメカニズムが共通しているのか検討の余地がある。それには実験だけでなく、今まで蓄積されたデータを整理し、CD54もしくはCD86のいずれかのみ陽性基準をクリアしているもの、両方が基準を満たしているもの、またそれぞれの動物実験での感差性の強弱との関係がどうかを照らし合わせる作業も重要であると考えられる。

一方、動物実験の代替法を確立するためには、in vivoとin vitroの結果を比較・検討するような評価実験をし、in vitroの系がin vivoの系の結果を十分に反映しているということを示さなければならないが、LLNAでのトリブチルスズの報告がなされておらず、LLNAでの解析も行った。その結果、10mg/mlでSIが7となり陽性と判定され、h-CLATとの結果と相関がみられた。しかしながら、今年度LLNAは一度しか試験しておらず、再現性を確認する必要はある。

E. 結論

トリブチルスズのアレルギー性の評価をin vitroの系であるh-CLATで行うことが可能であるかを検討するため、h-CLATでの結果とin vivoの系である

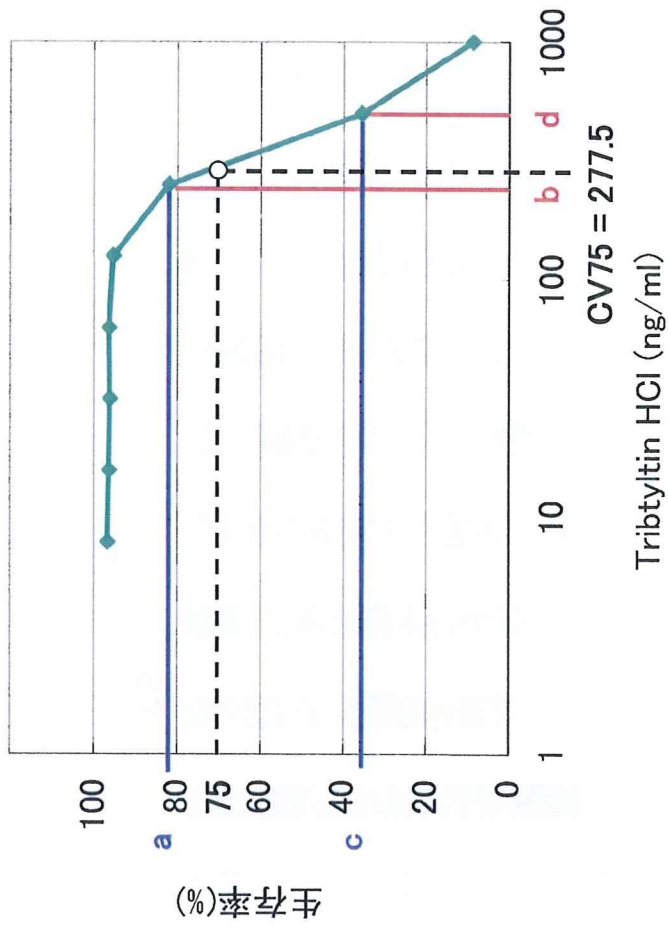
LLNA の結果の間で比較・検討した。
その結果、両者とも陽性判定基準をクリアーしていたことから、トリブチルスズが両解析法でもアレルギー性を有すると評価されることが示唆された。

F. 研究発表

1. Yeon Suk Jung, Reiko Kato, Toshie Tsuchiya Evaluation of the skin sensitization potential of biodegradable biomaterials using expression of co-stimulatory molecules on the naive THP-1 cell line. (in preparation)

2. Yeon Suk Jung, Reiko Kato, Yoshiaki Ikarashi, Toshie Tsuchiya The skin sensitizing potential of biodegradable biomaterials by non-radioisotopic modification of the local lymph node assay.
(in preparation).

図1:濃度設定試験



$$\text{Log CV75} = (75 - c) \times \text{Log}_{10} b - (75 - a) \times \text{Log}_{10} d / a - c$$

- a: 82%
- b: 250 ng/ml
- c: 35%
- d: 500 ng/ml

图2: h-CLAT一本試験(細胞生存率)一

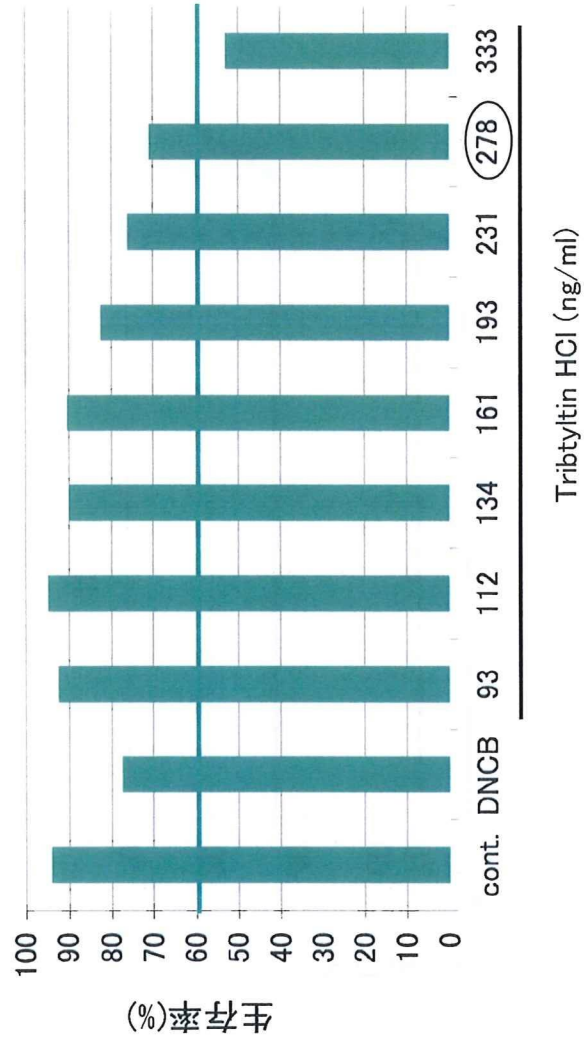


図3:h-CLAT - 本試験 (RFI値) -

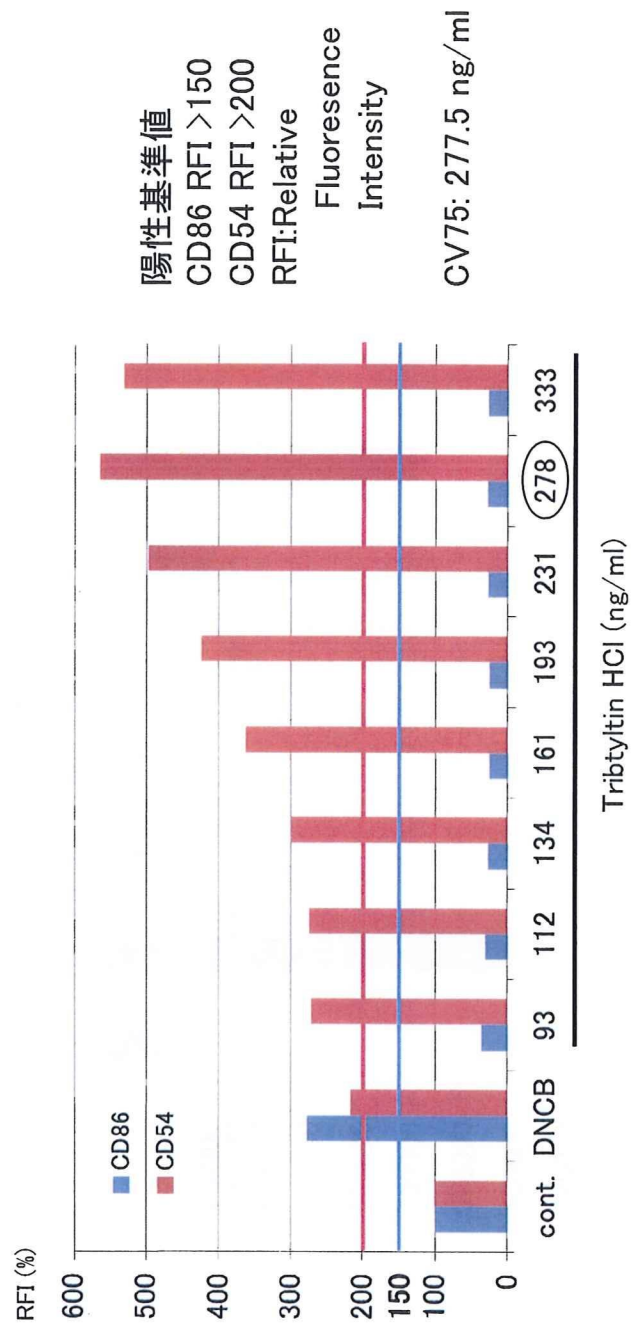
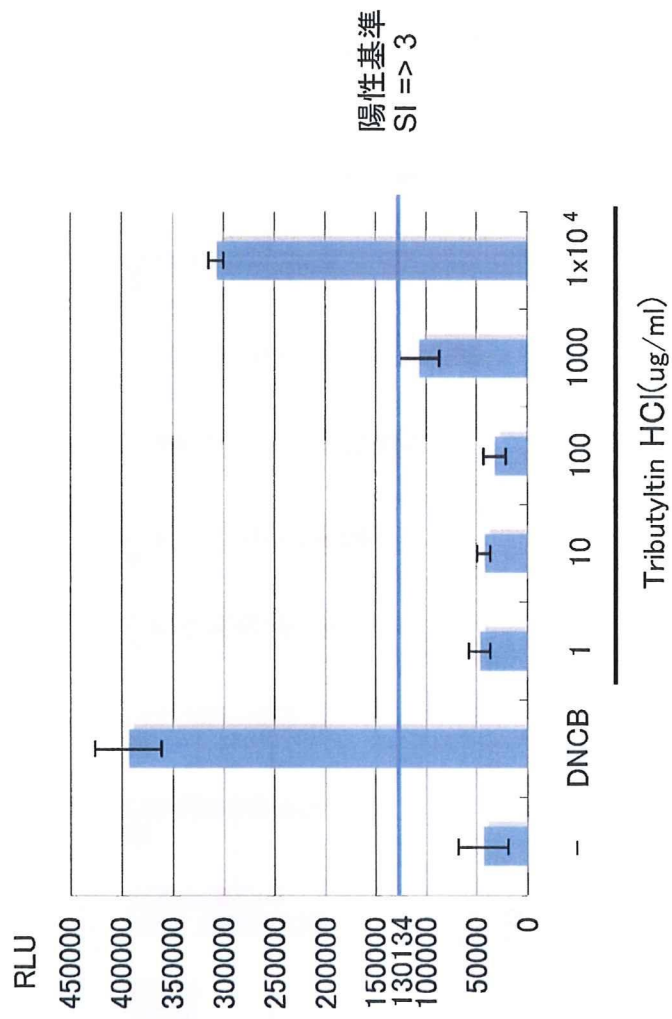


図4: LLNA



1 2. 医用材料埋植による炎症リスクアセス
メント手法開発に関する研究

中岡 竜介

厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業）
分担研究報告書

医用材料埋植による炎症リスクアセスメント手法開発に関する研究

分担研究者 中岡竜介 国立医薬品食品衛生研究所 療品部 室長

研究要旨

医用材料の埋植後に生じる生体反応と材料特性との関連性を考察するため、材料と細胞との *in vitro* での相互作用解析を通して材料表面特性が細胞に与える影響についての検討を行ってきた。3年目は、官能基に加えて材料表面の接触角にも着目し、自己組織化膜で調製した官能基表面と細胞との相互作用解析と考察を行った。

A. 研究目的

体内埋植型医療機器での炎症反応による不具合がいくつか報告されているが、炎症反応に関わらず埋植型医療機器によって生じる不具合は、主に機器を構成する材料に起因していると考えられる。機器を構成する材料の分解などに伴う物質や材料からの溶出物が炎症を引き起こすことが予想されるが、そのような場合には、原材料や抽出により調製した溶出物を用いた毒性試験などにより原因を明らかにすることができるため、それらの物質に起因したリスクは予め排除することが可能である。一方、生体と接触する機器の表面特性、例えば化学構造やその表面荒さ、材質に起因した表面自由エネルギー等に応じて、様々な生体反応が生じることが知られている。理想的には、生体内で生体組織と良くなじみ、半永久的に機能を保ち且つ生体に対して何ら障害を引き起こさないことが望ましい。しかしな

がら、医療機器として使用するにあたっては、一定期間必要な機能を保ち続けること、埋植可能な大きさに整形することなどの制限があるため、生体に対する影響のみを考慮しての設計及び作製は困難である。よって、医療機器に特定の材料を使用選択する際には、その材料を用いることによる利益とその材質や形状、特性などから生じる不可避な不利益とのバランスとを考慮しなければならない。その不利益を評価するためには、動物を用いた埋植試験が有効であるが、近年、動物愛護運動の高まりから、社会的にそのような埋植試験の減少が求められていること、また、費用などの観点から、*in vivo* 試験代替となる *in vitro* 手法開発が急務となっている。

医療機器によって生じる埋植後の生体反応を予測する上では、材料及びその溶出物による毒性もさることながら、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用も要

因の1つとなる。すなわち、その相互作用によって生じる炎症反応が埋植後に生じる不具合の要因となりうるため、従来の毒性評価とは異なる視点で材料によって引き起こされる炎症度合を *in vitro* で評価・予測できる方法が求められる。そのためには、材料・細胞間相互作用を従来よりも詳細に検討する必要がある。そこで、汎用性の高い種々の医用材料上での細胞挙動変化を検討して、埋植後の炎症反応とその医療機器表面との関連性を明らかにすることを目的として本研究を行っている。特に、表面特性を系統的に変化させたモデル表面の調製を試み、その上での細胞挙動変化を中心とした研究をこれまでにを行っている。このような研究で、表面特性とその材料と接触した細胞の挙動変化との関連を詳細に解明していくことが可能となり、その結果として今までよりも信頼性の高い医用材料の炎症リスク *in vitro* 評価が可能となることが期待される。本研究では、種々の表面特性をもつ自己組織化膜を利用したモデル表面の作製を試みるとともに、*in vitro* で細胞との相互作用解析を行い、その材料が実際に生体内に埋植された後に引き起こす生体反応、特に炎症反応程度との関連性を検討することを試みる。また、これらの検討を通じて、材料により引き起こされる炎症の機構を明らかにするための情報を得ることを試みる。

細胞の接着や接着直後の遺伝子発現変化においては、材料表面の水に対する接触角に影響されることが既に報告されている。官能基の種類に応じてその接触角も変化するため、異なる官能基上で観察された細胞挙動変化は、官能基、あるいは接触角いずれにより影響を受けているのかが明確でな

い。すなわち、細胞挙動変化の機構を明らかにするためには、官能基・細胞間相互作用と接触角（表面自由エネルギー）・細胞間相互作用のいずれが、あるいは両者がどの程度の割合でその変化を支配しているのか、を明らかにしなければならない。そこで、昨年度から、官能基以外の表面特性指標である水に対する接触角の影響を検討する目的で、単一表面に加え2種類の官能基をもつ表面を調製して検討を行っている。さらに、今年度は細胞分化以外に細胞の恒常性維持に重要な役割をもつ細胞間連絡機能への影響についても検討を行った。

B. 研究方法

本年度も、これまで同様、金蒸着表面への自己組織化膜形成を利用した官能基モデル表面作製とその特性解析を中心に研究を行った。

基材は、マツナミ社製の円形カバーガラス（15mm 径、厚さ 0.2mm）の片面に 3nm のチタン層をコートした後に 25nm の金層をコートしたものをを用いた（村中医療器製）。

この基材を、Pirahna 溶液（濃硫酸と過酸化水素水を 3 対 1 で混合した溶液）及び純水で洗浄、乾燥後、エタノール中で片末端にチオール基、もう片末端に種々の官能基を持つ市販の decanethiol 類と反応させることでモデル表面を調製した。今年度も、昨年度同様、以下に示す 5 種類の官能基試薬を使用して検討を行った。

1) メチル基、2) カルボキシル基、3) アミノ基、4) 水酸基、5) リン酸基

昨年度同様、1mM の undecanethiol 溶液に他の試薬 1mM 溶液を種々の比率で混合した溶液を用意し、そこに基材を 24 時間浸漬

後、洗浄、乾燥を行うことでモデル表面を調製した。調製したモデル表面の接触角を Sessile drop 法で、表面に存在する元素を ESCA で測定することで、モデル表面の状態を確認した。

最初に、表面接触角が同程度で異なる 2 種類の官能基をもつモデル表面が細胞分化挙動に与える影響を検討した。昨年度同様、調製した各種表面上に市販のヒト正常骨芽細胞 (NH0st) を培養し、その増殖と分化程度を評価した。10% FCS を含む α -MEM (α -MEM-10FCS) で継代培養した NH0st を所定数各種モデル表面上に播種した後、骨分化誘導因子 (β -glycerophosphate、dexamethasone、ascorbic acid) を添加した、あるいは無添加の α -MEM-10FCS で 1 週間培養を行い、所定期間毎に細胞数と ALP 活性をそれぞれ測定した。細胞数の指標としては、培地中に Tetracolor One 試薬を一定濃度になるように添加して 3 時間後に測定された吸光度を用いた。また、ALP 活性は既報に従って測定用試薬中で所定時間培養した試薬の吸光度から、既知濃度の ALP 試薬で得られた吸光度を基にその値を算出した。それらの結果を比較検討し、官能基及び接触角が細胞挙動に与える影響について考察を行った。

単一官能基が細胞間連絡機能に与える影響を評価する手段としては、Chinese hamster 由来の繊維芽細胞である V79 とその変異体を利用した簡便な手法である代謝協同阻害試験を選択した。この試験は、変異体が代謝できない 6-thioguanine を V79 が代謝して細胞毒性物質を生成し、その物質が細胞間連絡機能により変異体に移動して変異体の生育を妨げることを利用したものである。

その機能阻害が生じていると結果的に変異体のコロニー形成が促進されるため、生成コロニー数から阻害程度を推定することができる。この試験で各種モデル表面上での代謝協同阻害率を測定することにより、官能基表面が細胞間連絡機能に与える影響について検討した。具体的には、まず、モデル表面材料を、70%エタノールに一晩浸漬後洗浄なリン酸緩衝生理食塩水で洗浄することで滅菌した。その後、材料を 24-well plate に入れ、V79 を 10,000 個、その変異体 50 個を懸濁した M05 培地 (Earle の平衡塩類溶液培地に非必須アミノ酸、ピルビン酸ナトリウム (0.11 g/l)、L-グルタミン (0.292 g/l)、炭酸水素ナトリウム (2.2 g/l)、ペニシリン・ストレプトマイシン及び FCS 5% を含んだ培地) を 1ml 添加して細胞を播種した。4 時間培養した後、変異体が代謝できない 6-thioguanine を添加し、1 週間後に形成された変異体のコロニー数を計測することで細胞間連絡機能の阻害程度を判断した。

C. 研究結果

昨年度は、種々のモル比で混合したメチル基と水酸基を含む溶液で調製した表面上で培養した NH0sts の分化程度を評価して、接触角が NH0sts の分化に与える影響を検討した。今年度は、昨年度のデータを利用して、70°前後の接触角をもつメチル基と他の官能基から構成されるモデル表面を調製し、その上での NH0st の分化程度を評価した。調製時の各試薬混合比と調製した表面の接触角を以下に示す。

- 1) 水酸基 1 : メチル基 1 (接触角 69.2°)
- 2) カルボキシル基 2 : メチル基 1 (接触角 68.9°)

3) アミノ基 1 : メチル基 4 (接触角 75.7°)

4) リン酸基 1 : メチル基 4 (接触角 73°)

これらの他、培養用ディッシュ、未処理の金 (接触角 64.7°) 表面及びメチル基単独表面 (接触角 99.5°) を比較対象として使用した。まず、所定時間培養後に Tetracolor One を用いて評価した各モデル表面細胞数を吸光度で表したものを図 1 に示す。図からは、骨分化誘導因子の有無に関わらず、メチル基単独表面において細胞の初期接着及び増殖が抑制されていること、水酸基において細胞増殖が抑制されていることが示唆される。図 2 には、図 1 と同条件下での一定細胞数あたりに換算した ALP 活性比を示す。骨分化誘導因子の添加によりいずれの条件下でも ALP 活性は上昇すること、メチル基表面上での ALP 活性は他の表面上のものと比べて低いことが分かる。しかしながら、この骨分化の指標となる ALP 活性からは、メチル基以外のいずれの表面上でも骨分化に対する影響は認められなかった。

一方、単一官能基からなるモデル表面上で代謝協同阻害試験を行い、官能基が細胞間連絡機能に与える影響を検討した結果を、同時に行ったコロニー法による細胞毒性結果と共に図 3 に示す。昨年度の NHOst を用いた検討と同様、メチル基表面でのコロニー形成率がコントロールに対して低下していることが明らかとなった。しかしながら、NHOst を用いて得られた結果よりもその毒性の程度は低いものであった。また、NHOst 培養では毒性や細胞増殖抑制が認められなかったリン酸基表面でのコロニー形成率も低下傾向にあることが示された。代謝協同に関しては、メチル基及び水酸基表面で阻害が認められた。

代謝協同阻害試験は、V79 とその変異体との間で細胞間連絡機能が発揮できるよう両者がある程度の確率で接触できることが必要である。よって、この試験で材料上での阻害活性を評価する場合、化学物質の評価とは異なり、材料上に細胞が接着した後のその占有面積が結果を左右する因子となる。そこで、培養 1 日後の各種モデル表面上における細胞占有面積を SEM 写真及び光学顕微鏡写真からコンピュータソフト (ImageJ 1.42q, NIH) を用いて算出し、その面積と接触角、細胞毒性及び代謝協同阻害の関連性を検討した。その結果を図 4 及び 5 に示す。細胞の占有面積は、接触角が 65°程度で極大を示すことが認められた。また、代謝協同阻害と接触角との間に相関があることが示唆された。

D. 考察

医療機器によって生じる埋植後の生体反応は、その表面と周囲に存在する各種細胞との相互作用、すなわち生体と材料との界面における現象を捉え、その機構を明らかにすることが非常に重要である。材料表面の特性を決定する要因の一つとして表面の化学構成、すなわち表面官能基が考えられる。様々な官能基に対する生体反応を詳細に検討してその基礎的データを蓄積していくことは、様々な材料、特に高分子材料などの有機材料などから構成される医療機器のリスク評価を行うにあたって欠かすことができないと考えられる。よって、材料・細胞間相互作用解析は、埋植型医療機器を生体内で使用する際に生じる生体反応全般、特に不具合を予想・解析する上で非常に重要である。

生体が異物を排除するための機能、すなわち免疫機能を有するため、医療機器の埋植は少なくともその周辺部位には炎症反応が引き起こし、その後材料の特性に応じた反応を誘導すると考えられる。初期に生じる炎症反応程度は、その手術手技や機器の大きさ以外に、生体と接触するその材料の化学構造や表面特性が関連していることは古くから予想されており、事実、数多くの研究がこれまでに行われている。一方、自己組織化膜を利用した表面の構築とそれを用いた応用研究は、この10年強の間に飛躍的に発展してきており、化学構造を制御したモデル表面を調製する手段としては非常に有用である。本研究では、自己組織化膜を利用して調製したモデル表面特性とその表面と接触した細胞の挙動変化との関連性を検討し、埋植後の炎症反応を予測することが可能な新規 *in vitro* 手法が開発可能かどうかを考察した。今年度は、炎症を引き起こすメディエータを細胞集団間で伝達する一つ的手段にもなりうる、細胞集団の恒常性維持を担う重要な細胞間連絡機能に対する材料特性の影響を中心に検討を行った。

今年度も、昨年度同様メチル基用試薬に対して他の官能基用試薬を混合した溶液を用いて、2種類の官能基をもつ表面を調製した。今回は、可能な限り接触角による細胞挙動への影響を排除して官能基のみの影響を検討することを試み、接触角を同程度とした表面を4種類調製した。調製時の条件は昨年度の研究結果から設定し、おおよそ70°前後の表面を調製することができた。これらの表面上で培養した骨芽細胞の分化挙動変化を観察すれば、官能基が細胞分化に与える影響を正確に評価できると考えた

にも関わらず、図1、2に示したように4種類の表面上における細胞の接着、増殖及び分化程度には有意な差は認められなかった。ここから、いくつかの仮説を立てることができる。

1) 今回調製したような表面上の官能基は、細胞機能へ何ら影響を与えず、接触角で評価できるような全体としての表面特性が細胞挙動に影響を与える

2) 官能基は細胞挙動に影響を与えうるが、表面上に存在するメチル基がその影響を打ち消す

3) 自己組織化膜を利用した官能基表面ではその官能基の運動性に乏しいため、特定の分子との相互作用を妨げ、結果として細胞への影響を発揮できない

そこで、これらの仮説についての検討を行う目的で、単一官能基表面上で別の細胞機能変化を検討した。今年度は、細胞集団の恒常性維持においてその機能の一部を担う細胞間連絡機能に着目した検討を行った。図3には各種官能基上での代謝協同阻害試験の結果を細胞毒性試験結果と共に示しているが、メチル基及び水酸基上においてはその機能阻害が生じることが示唆される結果を得た。

これらの表面上における細胞の形態を観察したところ、阻害がみられた官能基表面上においては接着したV79は丸い形態をとって他と比べて占有面積が小さくなっていることが観察され、その伸展阻害を受けていることが示唆された。前述したように、代謝協同阻害試験においては、接着した細胞の占有面積が大きく結果を左右する。よって、その占有面積による効果と、官能基による効果とを区別しなければならない。

図5に示したように、占有面積と阻害との間に相関性が示唆されたことから、今回の阻害は細胞間連絡機能の本質的な阻害ではなく、細胞の伸展阻害に伴ったものである可能性が大きい。このことを確認する目的で、昨年度の検討で使用した種々の接触角をもつメチル基：水酸基混合表面を用いて代謝協同阻害試験を行った結果を、同様に測定した占有面積に対してプロットしたものを図6に示すが、図5で見られたような細胞の占有面積と代謝協同阻害との相関は認められなかった。これらのことは、V79の細胞間連絡機能が何らかの形で直接材料表面より影響を受けうることを示唆している。細胞間連絡機能と表面特性との関連性に関する検討は、今後、遺伝子及びタンパク質レベルでの検討を続けていく予定である。

なお、昨年度の検討では、骨芽細胞初期接着の接触角依存傾向が、骨分化誘導因子を培地中に添加した場合のみではあるが認められていた。今回、繊維芽細胞の培養1日後の占有面積を測定したところ、表面接触角が70°前後で占有面積が極大を示すことが認められた。すなわち、細胞の初期接着機構、あるいは細胞の伸展機構は基本的に材料表面の自由エネルギーに影響を受けることが示唆された。この点については、様々な細胞を用いて同様の検討を行い、細胞接着及び伸展を制御する機構を明らかにしていきたい。

今後、複数の官能基を用いた2官能基混合表面を用いて同様の検討を進めていくことで接触角、あるいは官能基が特定の細胞機能に影響を与えることが明らかになる可能性は大きい。これまでの検討は、材料

表面における複数の化学的及び物理化学的特性が複雑に絡み合って細胞挙動に影響を及ぼすことを示唆している。よって、検討に用いる細胞が異なれば材料表面から受ける影響も異なることが充分予想される。今後の検討においては、その点を十分に考慮して実験を進め、材料表面における細胞挙動変化、すなわち細胞に生じる反応と表面特性との関連を明らかにしていく。

今年度の報告には特に記していないが、モデル炎症系細胞の選択と実験系の構築の試みは継続して行っている。しかしながら、未だ適切な細胞及び実験系は構築できていない。今後は、株化細胞ではなく正常ヒト単球細胞などを用いての検討を行う必要がある。

E. 結論

いくつもの材料表面特性による細胞挙動への影響を別々に考慮するために、2種類の官能基からなるモデル表面を自己組織化膜により調製し、その上で骨芽細胞及び繊維芽細胞の機能変化を観察した。表面自由エネルギーの指標となる接触角が同程度で、構成する官能基が異なる表面上で骨芽細胞の分化を検討したが、官能基の違いによる分化挙動への影響は見られなかった。また、繊維芽細胞の細胞間連絡機能変化を検討したところ、その阻害程度と接触角、あるいは官能基との関連性は見いだせなかった。一方、細胞の初期接着挙動と接触角との間にはその相関が示唆されたことから、表面特性を表面自由エネルギーと化学構造とに分けて考えると、着目した細胞挙動に応じてその2つの特性が与える影響の度合いは異なり、それらの影響のバランスが重要で

あることが考えられた。もちろん、この2つ以外の要因も考慮する必要があるが、少なくとも表面特性の影響程度を化学的及び物理化学的特性に分けて詳細に検討することが、材料と相互作用した生体に引き起こされる様々な反応の機構を解明する上で重要であり、その検討手段として自己組織化膜を利用したモデル表面は非常に有用であることが本研究において示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

(研究業績「欧文」)

- 1) Atsuko Matsuoka, Agneta Önfelt, Yoshie Matsuda, Ryusuke Nakaoka, Yuji Haishima, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Toshie Tsuchiya. Development of an *in vitro* screening method for safety evaluation of nanomaterials. *Journal of Biomedical Materials and Engineering*, 2009, 19, 19-27.
- 2) Takashi Yamada, Ryusuke Nakaoka, Rumi Sawada, Atsuko Matsuoka, Toshie Tsuchiya. Effects of intracerebral microinjection of hydroxylated-[60] fullerene on brain monoamine concentrations and locomotor behavior in rats. *J. Nanoscience Nanotechnol.*, 2010, 10, 604-611.
- 3) Ryusuke Nakaoka, Yoko Yamakoshi, Kazuo Isama, Toshie Tsuchiya. Effects of surface chemistry prepared by self-assembled monolayers on osteoblast behavior. *J. Biomed. Mater. Res. A*, in press.

(研究業績「和文」)

なし

2. 学会発表

国内学会

- 1) 石川烈、石川格、中岡竜介、斉藤充弘、松山晃文、澤芳樹、土屋利江「TR実践のための戦略的高機能拠点整備事業 医用材料の安全性試験(1):カーボンナノチューブの細胞毒性と形質転換活性」、第47回日本人工臓器学会大会、新潟、2009年11月13、14日
- 2) 中岡竜介、松岡厚子「種々の官能基表面調製とその細胞挙動への影響について(2):細胞機能への影響を中心に」、第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16、17日
- 3) 石川烈、石川格、中岡竜介、斉藤充弘、松山晃文、澤芳樹、土屋利江「TR実践のための戦略的高機能拠点整備事業 医用材料の安全性試験(2):カーボンナノチューブとその誘導体の細胞毒性と形質転換活性」、第31回日本バイオマテリアル学会大会、京都、2009年11月16、17日

国際学会

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図1. メチル基と他の官能基から構成される2官能基モデル表面上で培養したヒト骨芽細胞の増殖挙動変化 (細胞数は、Tetracolor One を加えて一定時間培養した後の培地の吸光度で示した)

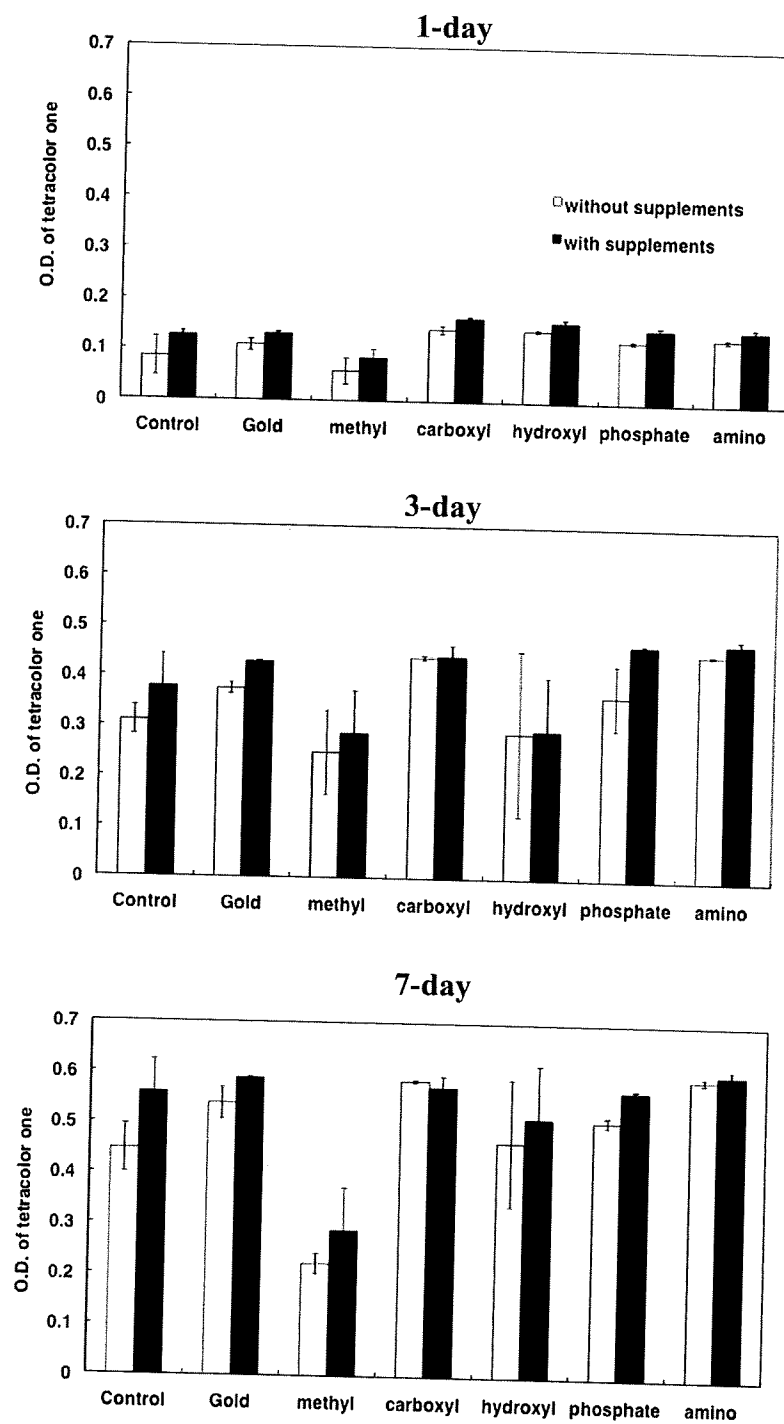


図2. メチル基と他の官能基から構成される2官能基モデル表面上で培養したヒト骨芽細胞のALP活性変化
 (ALP活性は、図1に示した吸光度の値を用いて規格化した値を示す)

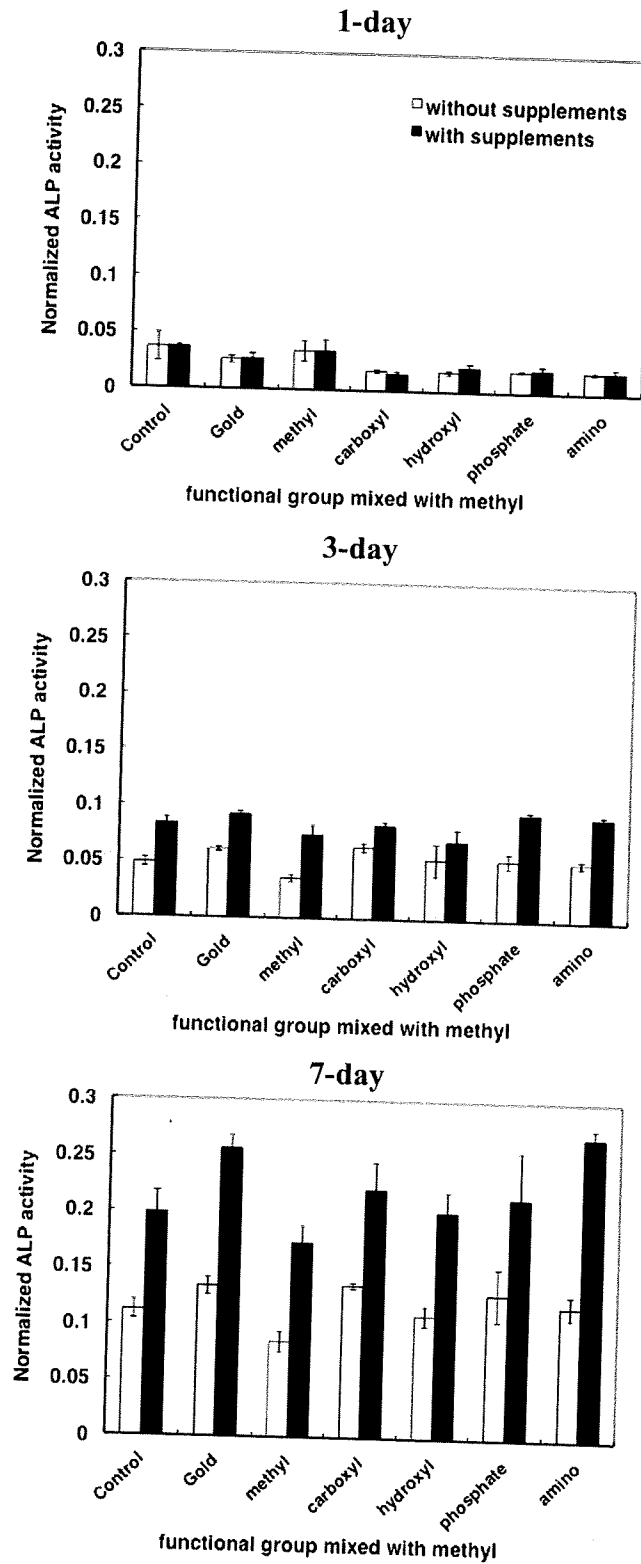


図3. 種々の単一官能基表面上における代謝協同阻害試験結果

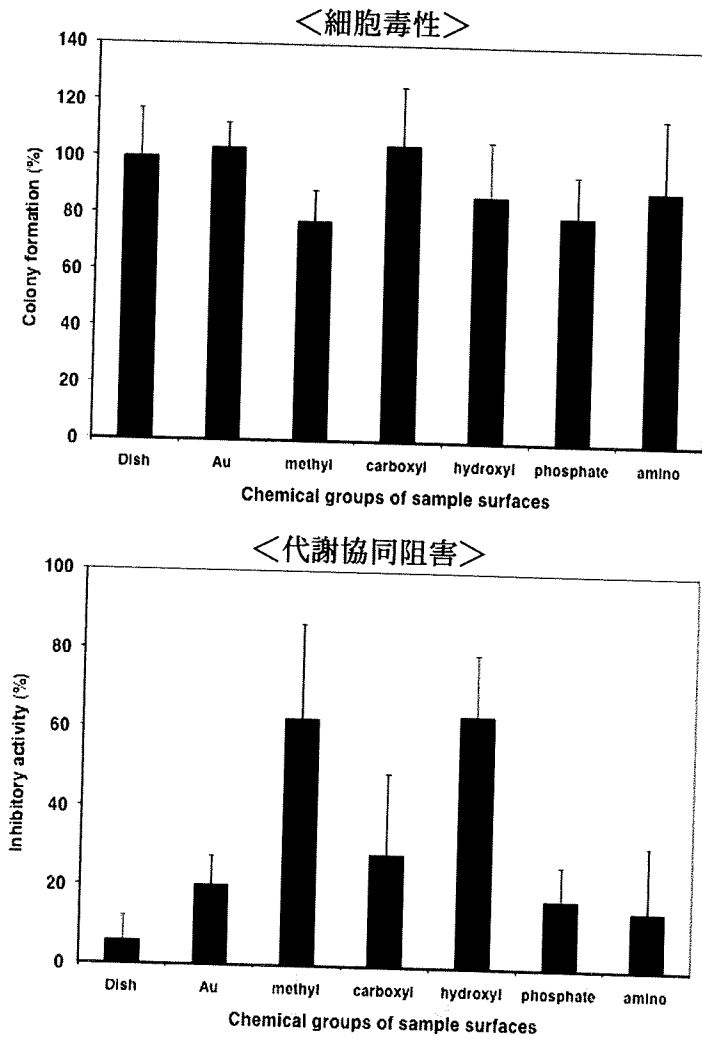


図4. 単一官能基表面の接触角と接着1日後の細胞占有面積との関連性

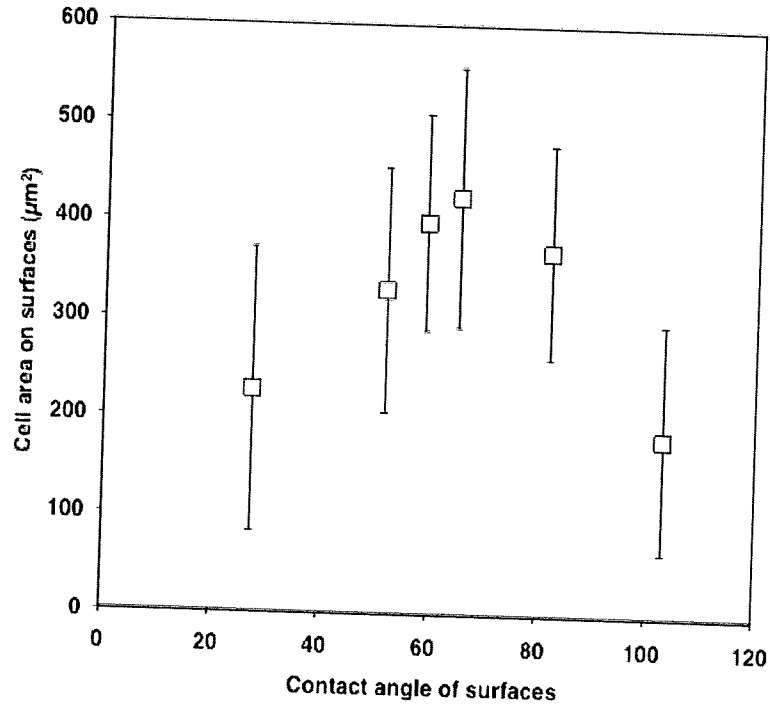


図5. 単一官能基表面に接着した細胞占有面積と細胞毒性及び代謝協同阻害との関連性

(○ : 細胞毒性、● : 代謝協同阻害活性)

