

表18. PMEA表面への吸着が抑制(AP/PP比<0.5)される血液凝固非関連蛋白質の吸着挙動

Protein ID			Peptide count	Relative ratio (sample/plasma)					
Code	Name	Score		Plasma	PHEMA	75/25	50/50	25/75	PMEA
A1AG1	Alpha-1-acid glycoprotein 1	213	6	1.00	0.09	0.01	0.02	0.02	0.01
A1AG2	Alpha-1-acid glycoprotein 2	261	5	1.00	0.03	0.03	0.06	0.03	0.05
A1BG	Alpha-1B-glycoprotein	259	8	1.00	0.06	0.05	0.04	0.04	0.04
A2MG	Alpha-2-macroglobulin	1132	44	1.00	0.03	0.02	0.05	0.03	0.02
AACT	Alpha-1-antichymotrypsin	275	8	1.00	0.07	0.06	0.07	0.08	0.03
AMBP	Protein AMBP	155	4	1.00	0.31	0.11	0.15	0.07	0.05
C4BPA	C4b-binding protein alpha chain	89	6	1.00	0.31	0.08	0.18	0.08	0.22
CERU	Ceruloplasmin	296	11	1.00	0.04	0.07	0.07	0.04	0.04
DC1L2	Cytoplasmic dynein 1 light intermediate chain 2	27	2	1.00	0.22	0.45	0.72	0.51	0.14
FETUA	Alpha-2-HS-glycoprotein	72	5	1.00	0.30	0.19	0.14	0.04	0.02
GELS	Gelsolin	186	8	1.00	5.48	0.51	0.42	0.62	0.08
HEMO	Hemopexin	283	11	1.00	0.03	0.03	0.02	0.02	0.01
HPT	Haptoglobin	277	16	1.00	0.02	0.01	0.07	0.03	0.01
HPTR	Haptoglobin-related protein	186	7	1.00	0.04	0.04	0.12	0.07	0.02
HRG	Histidine-rich glycoprotein	118	3	1.00	1.24	0.18	0.56	0.78	0.08
IC1	Plasma protease C1 inhibitor	170	4	1.00	0.30	0.17	0.26	0.11	0.08
K2C8	Keratin, type II cytoskeletal 8	78	3	1.00	0.42	0.42	0.47	0.29	0.23
MUC16	Mucin-16	28	2	1.00	0.40	0.71	2.30	0.85	0.08
PEDF	Pigment epithelium-derived factor	147	8	1.00	5.79	0.24	0.36	0.33	0.31
PZP	Pregnancy zone protein	158	5	1.00	0.05	0.04	0.09	0.02	0.02
RET4	Retinol-binding protein 4	103	3	1.00	0.05	0.04	0.02	0.03	0.00
THBG	Thyroxine-binding globulin	124	4	1.00	0.08	0.15	0.24	0.05	0.05
TISD	Butyrate response factor 2	19	2	1.00	0.10	0.33	0.32	0.74	0.05
TRFE	Serotransferrin	1226	47	1.00	0.02	0.03	0.05	0.03	0.02
TTHY	Transthyretin	227	9	1.00	0.05	0.04	0.07	0.04	0.03
VTDB	Vitamin D-binding protein	113	6	1.00	0.03	0.07	0.03	0.06	0.03
ZA2G	Zinc-alpha-2-glycoprotein	70	3	1.00	0.04	0.01	0.05	0.04	0.01
ZAGL1	Putative zinc-alpha-2-glycoprotein-like 1	22	2	1.00	0.02	0.01	0.04	0.01	0.01

表19. PMEA表面上で濃縮されない(0.5<AP/PP比<2.0)血液凝固非関連蛋白質の吸着挙動

Protein ID			Peptide count	Relative ratio (sample/plasma)					
Code	Name	Score		Plasma	PHEMA	75/25	50/50	25/75	PMEA
CD5L	CD5 antigen-like	43	2	1.00	3.75	3.27	6.23	4.10	0.68
DYHC1	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1	29	2	1.00	2.50	1.14	3.73	1.03	0.60
GPX3	Glutathione peroxidase 3	37	2	1.00	2.06	0.11	0.34	0.20	0.90
K1632	UPF0493 protein KIAA1632	19	2	1.00	5.32	5.94	11.17	9.41	1.36
LBP	Lipopolysaccharide-binding protein	118	3	1.00	9.73	4.27	7.15	3.53	1.71
NGAP	Ras GTPase-activating protein nGAP	22	2	1.00	3.52	5.97	6.30	6.15	0.68
SAMP	Serum amyloid P-component	253	9	1.00	7.78	20.92	12.54	6.11	1.04
TITIN	Titin	24	2	1.00	11.55	14.12	17.39	16.36	1.57
YTDC2	Probable ATP-dependent RNA helicase YTHDC2	25	2	1.00	3.29	3.17	3.89	3.33	0.59

表20. 血液適合性を評価するマーカー候補蛋白質の吸着挙動

A) PVP含有PSF材料

Protein ID			Peptide count	Relative ratio (sample/plasma)					
Code	Name	Score		Plasma	PSF1	PSF2	PSF3	PSF4	PSF5
VTNC	Vitronectin	1099	23	1.00	55.69	32.43	11.38	29.28	26.57
C1R	Complement C1r subcomponent	196	12	1.00	1.95	1.97	2.42	2.04	1.93
C1S	Complement C1s subcomponent	267	15	1.00	1.43	1.61	3.41	3.56	2.01
CO3	Complement C3	1807	113	1.00	0.13	0.18	1.02	0.47	0.34
CO5	Complement C5	504	34	1.00	0.16	0.20	1.62	1.78	0.97
FA12	Coagulation factor XII	58	3	1.00	0.37	0.49	2.14	1.86	2.85
FA7	Coagulation factor VII	111	2	1.00	5.34	5.17	3.05	5.06	3.32
FA9	Coagulation factor IX	134	10	1.00	9.23	11.80	7.12	17.90	7.04
FIBB	Fibrinogen beta chain	2716	56	1.00	7.98	6.77	2.65	2.96	2.94
FHR1	Complement factor H-related protein 1	143	8	1.00	0.72	1.27	4.37	5.54	3.57
PLD5	Inactive phospholipase D5			Not identified					
GPX3	Glutathione peroxidase 3	203	10	1.00	87.05	30.89	12.69	22.55	21.59
FINC	Fibronectin	800	48	1.00	1.31	1.97	1.76	0.82	0.67

B) PHEMA/PMEA材料

Protein ID			Peptide count	Relative ratio (sample/plasma)					
Code	Name	Score		Plasma	PHEMA	75/25	50/50	25/75	PMEA
VTNC	Vitronectin	513	13	1.00	12.41	11.00	22.31	12.84	3.91
C1R	Complement C1r subcomponent	192	10	1.00	1.32	2.13	7.34	1.01	0.55
C1S	Complement C1s subcomponent	108	7	1.00	1.14	1.54	4.56	0.78	0.21
CO3	Complement C3	4282	155	1.00	8.88	3.40	5.98	4.08	1.56
CO5	Complement C5	390	26	1.00	2.35	2.79	6.15	4.56	1.03
FA12	Coagulation factor XII	21	2	1.00	0.33	0.03	0.06	0.08	0.01
FA7	Coagulation factor VII			Not identified					
FA9	Coagulation factor IX	40	1	1.00	20.11	22.70	38.68	17.55	7.26
FIBB	Fibrinogen beta chain	254	10	1.00	0.08	0.03	0.06	0.03	0.02
FHR1	Complement factor H-related protein 1	133	7	1.00	26.43	6.89	11.94	10.05	1.56
PLD5	Inactive phospholipase D5	26	1	1.00	5.80	9.12	8.86	9.50	0.83
GPX3	Glutathione peroxidase 3	37	2	1.00	2.06	0.11	0.34	0.20	0.90
FINC	Fibronectin			Not identified					

C) 対照材料

Protein ID			Peptide count	Relative ratio (sample/plasma)					
Code	Name	Score		PSF	C-PET	CTA	PS	PTFE	UHMWPE
VTNC	Vitronectin	732	26	36.10	2.21	2.24	3.27	4.51	1.65
C1R	Complement C1r subcomponent	401	23	5.35	0.37	4.72	0.34	0.36	0.34
C1S	Complement C1s subcomponent	290	21	4.29	0.34	3.80	0.31	0.35	0.19
CO3	Complement C3	6308	192	0.29	0.56	1.07	0.27	1.23	0.30
CO5	Complement C5	758	59	0.53	0.25	2.18	0.47	1.80	0.24
FA12	Coagulation factor XII	69	5	3.46	0.05	0.27	0.04	0.48	0.03
FA7	Coagulation factor VII	93	5	0.32	0.16	0.01	0.20	1.18	0.15
FA9	Coagulation factor IX	139	7	0.36	0.90	0.30	0.08	2.28	1.15
FIBB	Fibrinogen beta chain	1312	54	8.75	0.35	1.14	0.30	3.07	1.03
FHR1	Complement factor H-related protein 1	90	7	0.79	0.31	0.33	1.83	0.72	0.26
PLD5	Inactive phospholipase D5	25	1	14.49	28.69	49.53	61.06	74.46	4.41
GPX3	Glutathione peroxidase 3	245	9	53.78	16.17	3.34	4.89	69.96	4.76
FINC	Fibronectin	385	23	1.80	0.19	0.33	0.22	3.38	0.51

分担研究報告書
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
「革新的医療機器開発を加速する規制環境整備に関する研究」

分担研究課題名

医用材料の血液適合性における細胞応答に関する研究

研究分担者	宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
研究協力者	酒井 恵子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
	中岡 竜介	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
	比留間 瞳	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
	田中 賢	山形大学大学院理工学研究科	

研究要旨

医用材料の生体適合性は、材料表面の物理学的特性により大きく影響される。本研究では、チタン系金属、合成高分子材料を培養基質として、様々な培養細胞株を用い、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について基礎的な検討を行った。

純チタン(Ti)ディスクを用いて CHL 細胞の増殖、細胞毒性、遺伝毒性について検討した結果、純 Ti 上で観察されたコロニーは、対照プレートに比べてコロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかったが、いずれの場合も感受性に差はなかった。2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer (MPC ポリマー)コートプレートでは、CHL, A549, RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した結果、CHL 細胞はスフェロイドを形成し、A549 及び RAW264.7 細胞はブドウ塊状に増殖した。細胞毒性では、細胞株により被験物質に対する感受性に差がみられた。CHL 及び A549 細胞の遺伝毒性には差がなかった。混合比の異なる poly(2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) / poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) コートシートでは、一晚の培地浸漬後、PHEMA100% コートの剥離が観察され、PMEA 25% PHEMA 75% シート表面にポリマーの膨潤が観察された。細胞接着試験では、PMEA/PHEMA シート間で播種翌日の接着細胞数に殆ど差はなく、細胞増殖試験においても PMEA/PHEMA シート間で増殖に差がなかった。

今後、バイオ合成高分子を培養基質とした際の、細胞応答の差異に影響を及ぼす因子についての解析(細胞表面の蛋白、接着因子、構造因子等)を進め、マーカー探索を行い、新規影響評価法としての可能性の確立を目指す。

A. 研究目的

医用材料の生体適合性は、材料表面の物

理的な特性により大きく影響される。チタン系金属は、強度、軽さ、耐食性、耐熱性

を備え、アレルギー性も低く、優れた生体適合性を有することから、医用材料として汎用されている。一方、2-methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer (MPC ポリマー)、poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA)等の生体適合性を有する合成高分子材料は、蛋白質、ペプチドに対する吸着抑制、細胞接着抑制能を示すことから、人工臓器、血液接触医療用チューブ、カテーテル、コンタクトレンズ等の医療機器に応用されている。

一方、チャイニーズ・ハムスター由来線維芽細胞株 (CHL) は、医薬品、化学物質、医療機器等の安全性評価に長年使用されており、細胞毒性、遺伝毒性に関する多くのデータの蓄積を有している。本研究では、チタン系金属、合成高分子が、培養基質として、細胞の増殖、コロニー形成、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について、基礎的な検討を行った。さらに、CHL 細胞に加えて、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549、マウス由来マクロファージ系細胞株 RAW 264.7 等の培養細胞株を用い、合成高分子基質上における細胞毒性の感受性について、比較検討を行った。

今後、合成高分子を培養基質とした際の、細胞応答の差異に影響を及ぼす因子についての解析（細胞表面の蛋白、接着因子、構造因子等）を進め、マーカー探索を行い、新規影響評価法の確立を目指す。

B. 研究方法

1. 材料

1) 純チタン (Ti) ディスク

純 Ti ディスク (33.5 mmφ x 2 mm (表面研磨仕上げ Ra = 0.4 程度)、ナカシマメディカル(株)) を用いた。

2) 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymer コートプレート (MPC プレート)

MPC プレートとして、LIPIDURE®コートプレート (サーモフィッシュャーサイエンティフィック(株)) の 6-well または 96-well プレートを用い、対照として、Nunc 社のプレートを使用した。

3) 合成高分子材料 PMEА/PHEMA コートシート (PMEA/PHEMA シート)

三菱樹脂製 pre-coated PET シート (34 mmφ) に、poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA) / poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA)をスピンコートして用いた。

PMEA/PHEMA の混合液は、PMEA:

PHEMA = 0% : 100%, 25% : 75%, 50% : 50%, 75% : 25%, 100% : 0%の 5 種類を用いた。

PMEA/PHEMA 液は、共同研究者の田中先生より供与いただいた。

2. 細胞株および培養方法

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 CHL は、国立衛研で樹立された株で基盤研の JCRB 細胞バンク (吹田)、American Type Culture Collection (ATCC) (USA)にも登録され、遺伝毒性試験に汎用されている。A549 はヒト肺由来細胞株で、JCRB 細胞バンク (吹田) より購入した。RAW264.7 細胞はマウスの単球性白血病由来のマクロファージ系細胞株で、International Alliance for NanoEHS Harmonization (IANH)より入手した。

CHL 細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、penicillin-streptomycin を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO)にて、37°C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。A549 細胞は、10% 非働化 FBS、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO)を含む MEM にて、37°C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。RAW264.7 細胞は、10% 非働化 FBS、2 mM L-glutamine (GIBCO)、penicillin-streptomycin を含む

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (GIBCO)にて、37°C、5% CO₂-95% air インキュベーターで培養した。各細胞株は、3-4日ごとに継代した。

3. 純 Ti ディスクを用いた試験

1) 細胞増殖試験

35 mmφプレート (IWAKI) に純 Ti ディスクを配置し、CHL 細胞を播種 (2×10^4 cells/2 mL) し、4 日間に渡って細胞数をカウントした。

2) 細胞毒性試験・コロニー法

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、100 個の CHL 細胞を 35 mmφプレートに配置した純 Ti ディスク上及び、対照の 35 mmφプレートに播種し、翌日、被験液 (金属化合物) を添加後、さらに 5 日間または 7 日間静置培養した。その後、ギムザ染色してコロニーを計測し、陰性対照群のコロニー数に対する割合 (コロニー形成率) を算出した。

3) 遺伝毒性試験・in vitro 小核試験

CHL 細胞を 35 mmφプレートに配置した純 Ti ディスク上及び、対照の 35 mmφプレートに播種 (3×10^4 cells/2 mL) し、翌日、被験液を添加して 48 時間培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、低張処理、固定処理を行い、小核観察用標本を作製した。標本はアクリジン オレンジで染色し、核及び細胞質を蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) (Kyowa Hakko Kirin) を用いた。

4. MPC プレートを用いた試験

1) 細胞増殖試験

6-well MPC プレートに、CHL, A549, RAW264.7 細胞を播種 (2×10^4 cells/2 mL) し、1 週間に渡って、形態観察及び細胞数をカウントした。対照として、Nunc 社の 6-well プレートを用いた。

2) 細胞毒性試験・ATP 法

CHL 細胞 (10×10^4 cells/well)、A549 細胞 (0.5×10^4 cells/well) 及び RAW264.7 細胞 (10×10^4 cells/well) を、96-well MPC プレートに播種し、24 時間後に被験液 (金属化合物) を添加し、さらに 6 時間及び 24 時間培養した。細胞を蛍光測定用の白色プレートに移し、CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (ATP 試薬, Promega) を添加し、遮光、室温で 45 分または 90 分間反応させた。発光シグナルをルミノメーターで測定した。対照として、Nunc 社の白色 96-well プレートに細胞を播種して同様の試験を行った。

3) 遺伝毒性試験・in vitro 小核試験

CHL 細胞及び A549 細胞を 6-well MPC プレート及び対照 Nunc 社プレートに播種 (3×10^4 cells/2 mL) し、翌日被験液を添加して 48 時間培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、低張処理、固定処理を行い、小核観察用標本を作製した。標本はアクリジン オレンジで染色し、核及び細胞質を蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質として MMC を用いた。

5. PMEА/PHEMA シートを用いた試験

1) 培地浸漬試験

6-well プレート (Costar) に、PMEА/PHEMA シート (PMEА : PHEMA = 0% : 100%, 25% : 75%, 50% : 50%, 75% : 25%, 100% : 0% の 5 種類及び未コートシート) を設置し、UV 滅菌 (5 min x 2) した。PBS または MEM 培地を 3 mL/well 添加し、一晚 CO₂ インキュベーターでインキュベートした。翌日シートを取り出し、水洗 3 回後風乾した。シート表面を SEM により観察した。

2) 細胞播種試験

6-well プレートに、5 種類の PMEА/PHEMA シート及び未コートシート

を設置し、UV 滅菌 (5 min x 2) した。培地 3 mL を添加し、シート裏面の気泡を除去した。培地を除去し、シートを 6-well プレートに密着させた後、CHL 細胞液 (3×10^5 cells/3 mL) をシート全体に播種し、一晚培養した。形態観察後、シート上、6-well プレート上、培養上清に分けて細胞を回収し、細胞数を計測した。対照として、Costar 社の 6-well プレートに細胞を播種した。細胞回収後のシートは、水洗 3 回後風乾し、シート表面を SEM により観察した。

3) 細胞増殖試験

6-well プレートに、PMEA/PHEMA シート (PMEA : PHEMA = 25% : 75%, 50% : 50%, 75% : 25%, 100% : 0% の 4 種類及び未コートシート) を設置、UV 滅菌 (5 min x 2) した。培地 3 mL を添加し、シート裏面の気泡を除去した。培地を除去し、シートを 6-well プレートに密着させた後、CHL 細胞液 (3×10^5 cells/3 mL) をシート中心部に播種した。6-well プレートを 30 分間クリーンベンチ内で静置した後、CO₂ インキュベーターで培養した。4 日間に渡って、形態観察、細胞数を計測した。対照として、Costar 社の 6-well プレートに細胞を播種した。

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 研究結果

1. 純 Ti ディスクを用いた試験

純 Ti 上における CHL 細胞の増殖は、対照プレートと同様であった (図 1)。コロニー形成については、純 Ti 上で観察されたコロニーは、対照プレートに比べてコロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかった (図 2)。細胞毒性試験の IC₅₀ 値は、CdSO₄ 処理では、4.5 μ M (control) 及び 7.3

μ M (Ti)、ZnO 処理では、14.2 μ g/mL (control) 及び 15.5 μ g/mL (Ti) で、対照プレートと比べて細胞毒性に大きな差はなかった (図 3)。次に、CHL 細胞を用いた小核試験により遺伝毒性について検討した結果、小核の出現頻度 (MN-total) は、未処理では 0.9% (control), 1.2% (Ti)、MMC 処理では 26.3% (control), 26.3% (Ti) で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった (表 1)。また M 期の細胞の割合 (MP)、多核細胞の割合 (Multi-N)、変形核の割合 (TF-N) も、未処理、MMC 処理で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

2. MPC プレートを用いた試験

MPC プレートに CHL, A549, RAW264.7 細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した。その結果、CHL 細胞では、細胞播種数時間後、幾つかの細胞同士が凝集し、その後、数十〜数百個の細胞からなるスフェロイドを形成した (図 4)。スフェロイド形成後の倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く 3〜4 日で定常期となった (図 5)。これに対して、A549 及び RAW264.7 細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した (図 6, 8)。倍加時間は、A549 細胞では対照プレートの約 4 倍で (図 7)、RAW264.7 細胞では、どちらのプレートにおいても同じ程度であった (図 9)。次に、MPC プレートを用い CdSO₄, ZnO に対する細胞毒性について検討したところ、CHL 細胞では、CdSO₄ の毒性は MPC プレートの方が対照プレートに比べて弱く、ZnO に対する毒性も MPC プレートの方が若干弱かった (図 10)。A549 細胞では、CdSO₄ の毒性は MPC プレートの方が対照プレートに比べて弱く、ZnO に対する毒性は、24 時間目において、MPC プレートの方が強かった (図 11)。RAW264.7 細胞では、CdSO₄ の

毒性は両プレート間で大きな違いはなく、ZnO に対する毒性は、MPC プレートの方が強く、6 時間目に毒性の差が顕著に観察された (図 12)。これらの細胞毒性の IC₅₀ 値を比較した結果を表 2 に示した。CdSO₄ に対する毒性は、CHL 及び A549 細胞で MPC プレートの方が対照プレートに比べて弱く、ZnO に対する毒性は、A549 細胞で MPC プレートの方が対照プレートに比べて強く、細胞株により、被験物質に対する感受性に差がみられた。

次に、CHL 及び A549 細胞細胞を MPC プレートで培養し、小核試験により遺伝毒性について検討した (図 13)。その結果、小核の出現頻度 (MN-total) は、CHL 細胞では、未処理 0.9% (control), 1.4% (MPC)、MMC 処理(0.1 μ g/mL, 48h) 10.4% (control), 10.1% (MPC)、A549 細胞では、未処理 2.6% (control), 3.3% (MPC)、MMC 処理(0.1 μ g/mL, 48h) 5.6% (control), 8.5% (MPC)で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった (表 3)。また、MP、Multi-N、TF-N の頻度も、未処理、MMC 処理で、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

3. PMEА/PHEMA シートを用いた試験

1) 培地浸漬試験

三菱樹脂製 pre-coated PET シート (34 mm ϕ) に、PMEA/PHEMA 混合液 (PMEA : PHEMA = 0% : 100%, 25% : 75%, 50% : 50%, 75% : 25%, 100% : 0%) を、当研究室にてスピンコートしたものを研究に用いた。(スピンコートの条件及びコートの状態の測定に関しては、分担研究者・中岡の報告参照。) 6-well プレートに、5 種類の PMEА/PHEMA シート及び未コートシートを設置し、UV 滅菌後、PBS または MEM 培地を添加し、一晚浸漬試験を行った。翌日シートを水洗、風乾後、シート表面を SEM により観察した (図 14)。その

結果、PHEMA100%では、PBS、MEM 培地ともに、コートの剥離 (ポリマーが膨潤後、破裂した跡) が観察された。また、PMEA 25% PHEMA 75%では、PBS、MEM 培地共に、シート表面の所々にポリマーの膨潤が観察され、その現象は PBS で顕著であった。他の混合比の PMEА/PHEMA シートでは、培地浸漬による変化は観察されなかった。

2) 細胞播種試験

次に、PMEA/PHEMA シートに CHL 細胞を播種し、一晚培養した。細胞の播種は、予め培地の添加、除去により 6-well プレートに密着させた PMEА/PHEMA シートに、CHL 細胞液をシート全体に播種する方法で行った。その結果、PHEMA100%では、コートの剥離が観察され、細胞はシート上面の所々に塊になって接着し、それ以外はシートの十字部分 (スピンコート跡) に接着していた (図 15)。他の混合比の PMEА/PHEMA シートでは、対照に用いた 6-well プレートと同様に細胞が全体に接着していた。シート上、6-well プレート上、培養上清中の細胞数を計測した結果を表 4 に示した。PMEA/PHEMA シートに接着した細胞数は、PMEA100%では 5.9×10^5 cells で若干少なかつたものの、他の混合比の PMEА/PHEMA シートの $6.0 - 6.9 \times 10^5$ cells と大きな差はなかった。培養上清中の細胞数は、6-well プレートでは全細胞の 0.4% であったのに対し、PMEA/PHEMA シート及び未処理シートでは 1.6 - 8.5%であった。また、PMEA/PHEMA シートではなく 6-well プレート上に接着していた細胞数は、全細胞の 13 - 28%であった。この結果より、以降の実験では、細胞をシート中心部に播種する方法に変更することにした。上記の細胞回収後のシートを、水洗、風乾後、シート表面を SEM により観察した結果を、図 16 に示した。培地浸漬試験 (一晚) の

時と同様、PHEMA100%では、コート剥離（ポリマーが膨潤後、破裂した跡）が観察された。特に十字部分では、中心部では細かいポリマーの膨潤または剥離、十字の端ではポリマーの剥離が見られた。PMEA 25% PHEMA 75%、PMEA75% PHEMA 25%、PMEA 100%では、表面の所々にポリマーの膨潤が観察された。以上の結果より、以降の実験では、PHEMA100%は除外することにした。

3) 細胞増殖試験

PHEMA100%を除いた4種類のPMEA/PHEMAシート（PMEA:PHEMA = 25%:75%, 50%:50%, 75%:25%, 100%:0%）及び未コートシートにCHL細胞を播種し、細胞増殖試験を行った。CHL細胞液はシート中心部に播種し、細胞がシートの端から6-wellプレートにできるだけこぼれないよう、プレートを30分間クリーンベンチ内で静置してからCO₂インキュベーターに移した。播種30分後、3時間後、培養1日後及び3日後の細胞の形態観察をした結果を図17に示した。

PMEA25% PHEMA75%では、細胞播種30分後の観察で、亀の子のような亀裂が観察されたが、3時間後には消失した。

PMEA50% PHEMA50%では、培養1日後より、培養上清に油滴の様なもの（剥がれたポリマー？）が観察された。細胞増殖は、いずれの混合比においても、対照の6-wellプレート上と同じ程度であった（図18）。細胞は、播種したシート中心付近で2-3日目に既に密になっており、周辺部に増殖が広がっていった。6-wellプレート端にシートからこぼれた細胞は5-10%程度で、そのままプレートの端周辺で増殖していた。

D. 考察

1. 純Tiディスクを用いた試験

純Tiディスクを用いて細胞の増殖について検討した結果、純Ti上のCHL細胞のコロニー形成は、対照プレートに比べて、コロニーの大きさは小さめで、数も若干少なかったが、細胞増殖試験においては、両者における増殖曲線はほぼ同様であった。このことから純Ti上では、細胞密度が低い場合には、細胞増殖サイクルへの進行が遅れる可能性が示唆されたが、細胞密度がある程度以上であれば、細胞増殖の速度は、純Ti上においても培養プレートと同程度であると考えられた。CdSO₄、ZnOに対する細胞毒性を検討した結果、IC₅₀値は、対照プレートと差はなく、また、小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかったことから、純Ti上で培養したことによる、細胞毒性、遺伝毒性への影響はないと考えられた。

2. MPCプレートを用いた試験

MPCプレートにCHL, A549, RAW264.7細胞を播種し、細胞形態、増殖について検討した結果、CHL細胞はスフェロイドを形成して増殖したが、A549及びRAW264.7細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した。スフェロイドを形成したCHL細胞の場合には、細胞播種数時間後、幾つかの細胞同士が凝集し、数日掛けて数十-数百個の細胞からなるスフェロイドまで成長し、その後スフェロイドが合体する像が観察された。そのため、初めの数日間の細胞倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く3-4日で定常期となった。これは、スフェロイドの成長に伴い、スフェロイドの中心部にある細胞への酸素や栄養分の供給が不十分になるためであると考えられた。これに対して、A549及びRAW264.7細胞では、スフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増

殖したが、その倍加時間は、RAW264.7細胞ではどちらのプレートにおいても同じ程度であったのに対して、A549細胞では対照プレートの約4倍であった。RAW264.7細胞はマクロファージ様細胞株で、活性化マクロファージになっていない通常の増殖状態においては細胞の接着性が弱く、継代の際にもトリプシン処理ではなくピペティングにより細胞を剥がすことができるほどである。そのためMPCプレート上においても、対照プレートと変わらない倍加時間で増殖したと考えられる。それに対して、A549細胞は接着細胞であり、A549細胞の増殖が、細胞接着に大きく依存しているためにMPCプレート上での倍加時間が遅くなったと考えられた。本研究では3種類の細胞をMPCプレート上で培養したが、細胞により形態、増殖がそれぞれ異なっていたのは興味深い知見であった。特に、同じ接着タイプのCHL及びA549細胞で増殖形態に差が生じた理由については、細胞表面の蛋白、接着因子、構造因子等が異なっているためであることが予想され、今後、他の細胞についても検討を広げ、詳細な解析を進めることにより、有用な情報が得られることが期待される。さらに、MPCプレートを用いて細胞毒性を比較した結果、細胞株により、被験物質に対する感受性に差がみられた。これは、MPCプレート上での細胞の形態、増殖の差が関わっていると考えられた。MPCプレート上で、CdSO₄、ZnOに対する毒性が異なったことは、被験物質の物性との関連が予想されるが、そのメカニズムを明らかにできれば、合成高分子等の医用材料の安全性評価の上で、有用な知見となると思われる。

3. PMEА/PHEMAシートを用いた試験

PMEА/PHEMAシートを用いた試験については、前年度に実施予定であったが、プ

レートへの直接コーティングの結果、PBSまたは培地の浸漬によりコートが剥離してしまったため、今年度は、くり抜いたPETシートに、当研究室でPMEА/PHEMA混合液をスピコートしたものを試験に供することにした。シートの大きさは、蛋白吸着、遺伝子発現解析、蛋白発現解析を行う分担研究者間で共通にするため、34mmφとした。まず始めに予備検討として、PBS及び培地への浸漬試験（一晚）、次にCHL細胞播種試験（一晚）を行った。その結果、PHEMA100%では、コートの剥離が観察され、また細胞がシート裏側の十字部分（スピコート時にシートを吸着している部分）に集中して接着していたことから、細胞増殖試験では、PHEMA100%は除外して行うことにした。また、細胞の播種方法に関しても、細胞液をシート全体に播種すると、シートの端外側から裏側に回り、6-wellプレートに細胞が接着してしまうことが判明した。そこで、細胞増殖試験においては、シートの中心部に細胞を播種し、さらに30分間クリーンベンチ内で静置させることにより、細胞ができるだけ多くシート上に留まるよう工夫したが、その結果、細胞播種したシート中心付近では、2-3日目に既に細胞が密になっており、その後周辺部に増殖が広がっていった。細胞増殖試験では、クリーンベンチからCO₂インキュベーターへプレートを移動させた播種30分後及び、細胞接着が進んでいる播種3時間後にも形態観察を行った。PMEА25%PHEMA75%では、播種30分後で、亀の子のような亀裂が観察され、3時間後には消失しているのが観察されたが、これは、シートへのスピコートを1%溶液125μL滴下、2回塗布の条件で行ったため、コーティング層が厚くなっており、表層に亀裂が入ったと考えられた。PMEА/PHEMAシートを用いた試験については、シートのコ

ート法、播種細胞数、播種法等の更なる検討が必要であると考えられた。CHL 細胞を用いて、細胞の増殖、細胞毒性、遺伝毒性等に及ぼす影響について、引き続き検討を行う予定である。

今後さらに、MPC、PMEA/PHEMA を始めとしたバイオ合成高分子を培養基質とした際の、細胞応答の差異に影響を及ぼす因子についての解析（細胞表面の蛋白、接着因子、構造因子等）を進め、マーカー探索を行う。また、血液適合性に関連して、MPC ポリマーを用いて、マウスマクロファージ細胞（RAW264.7）、ヒト単球細胞（THP-1, U937）などを用いて、サイトカインをはじめとするマクロファージの応答を指標として、新規影響評価法の確立を目指したい。

E. 結論

本研究において、

1) 純 Ti ディスク

CHL 細胞を用いて、細胞増殖、細胞毒性及び遺伝毒性について検討した結果、

1. 細胞増殖は、対照プレートと同様であった。

2. コロニー形成については、純 Ti 上では対照プレートに比べてコロニーの大きさが小さく、数も若干少なかった。CdSO₄、ZnO に対する細胞毒性を検討した結果、対照プレートと比べて細胞毒性に大きな差はなかった。

3. 小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC 処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

2) MPC ポリマープレート

CHL, A549, RAW264.7 細胞を用いて、細胞増殖、細胞毒性及び遺伝毒性について検

討した結果、

1. CHL 細胞は、細胞播種数時間後、幾つかの細胞同士が凝集し、その後、数十〜数百個の細胞からなるスフェロイドを形成した。スフェロイド形成後の倍加時間は対照プレートとほぼ同じであったが、対数増殖期は短く 3〜4 日で定常期となった。これに対して、A549 及び RAW264.7 細胞はスフェロイドを形成せず、ブドウ塊状に増殖した。倍加時間は、RAW264.7 細胞では、どちらのプレートにおいても同じ程度であったが、A549 細胞では対照プレートの約 4 倍であった。

2. CdSO₄, ZnO に対する細胞毒性について検討したところ、CHL 及び A549 細胞では、CdSO₄ の毒性は MPC プレートの方が対照プレートに比べて弱く、RAW264.7 細胞では、両プレート間で大きな違いはなかった。ZnO に対する毒性は、A549 及び

RAW264.7 細胞で MPC プレートの方が強く、A549 細胞では 24 時間目、RAW264.7 細胞では 6 時間目に、毒性の差が顕著に観察された。

3. CHL, A549 細胞において小核試験により遺伝毒性について検討した結果、未処理、MMC 処理いずれの場合も、対照プレートと比べて殆ど差はなかった。

3) PMEA/PHEMA シート

PMEA/PHEMA シート（5 種類の混合比及び未コートシート）に対する培地浸漬試験、細胞播種試験を行った結果、

1. 一晚培地浸漬後、PHEMA100%シートでは、コートの剥離が観察され、PMEA 25% PHEMA 75%では、シート表面の所々にポリマーの膨潤が観察された。他の混合比の PMEA/PHEMA シートでは、培地浸漬による変化は観察されなかった。

2. CHL 細胞は、PHEMA100%シートでは、シート上面の所々に塊になって接着し、そ

れ以外はシートの十字部分（スピンコート跡）に接着していた。他の混合比のPMEA/PHEMAシートでは、対照に用いた6-wellプレートと同様に細胞が全体に接着しており、接着細胞数に大きな差はなかった。しかしながら、全細胞の13 - 28%が、シート上ではなく、6-wellプレート上に接着していた。

PMEA/PHEMAシート（PHEMA 100%を除く4種類の混合比及び未コートシート）に対するCHL細胞増殖試験を行った結果、細胞増殖は、いずれの混合比、未処理シートにおいても、対照の6-wellプレートと差がなかった。細胞は、播種したシート中心付近で2 - 3日目に既に密になっており、周辺部に増殖が広がっていった。6-wellプレート端にシートからこぼれた細胞は5 - 10%程度で、そのまま端周辺で増殖していた。PMEA/PHEMAシートを用いた試験については、シートのコート法、播種細胞数、播種法等の更なる検討が必要であると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

- 1) Miyajima-Tabata A., Sakai K., Kato R., Matsuoka A.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers., Eurotox 2012 (Stockholm, 2012.6)
- 2) Kubo T., Hori T., Kuroda Y., Hojyo M., Miyajima A., Sunouchi M., Anne Corlu A., Morel F., Ozawa S., Sekino Y., Ishida S. : Comparative analyses of genomic DNA methylation and gene expression in hepatic cells. 第27回日本薬物動態学会年会（東京、2012.11）
- 3) 宮島敦子、加藤玲子、酒井恵子、松岡厚子：高分子医用材料上で培養した細胞の細胞毒性および遺伝毒性、2012バイオマテリアル学会（仙台、2012.11）

G. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

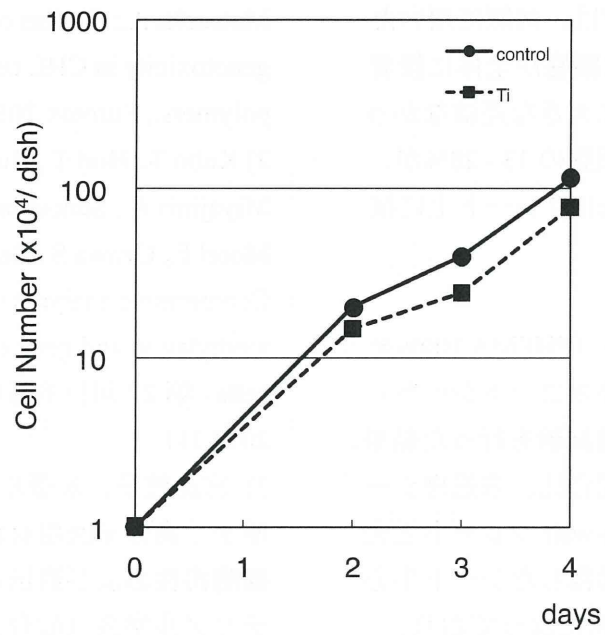


図1 Ti プレート上で培養したCHL細胞の増殖曲線

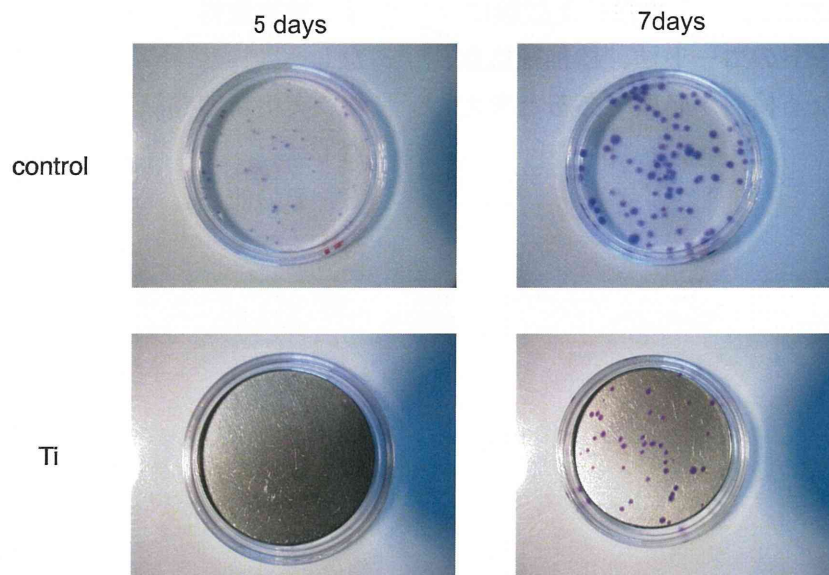
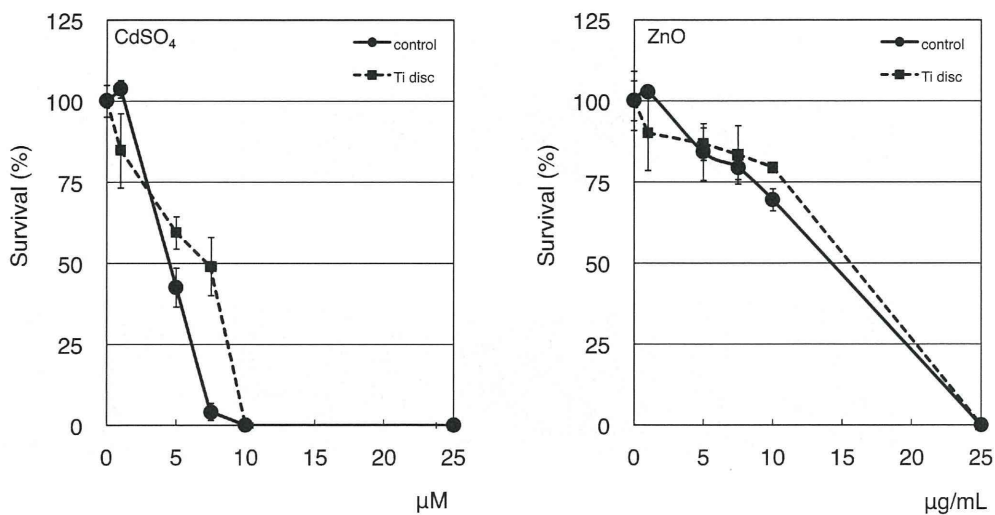


図2 Ti プレート上でのCHL細胞コロニー試験



IC₅₀ (Colony formation)
CdSO₄; 4.5 μM (control), 7.3 μM (Ti), ZnO; 14.2 μg/mL (control), 15.5 μg/mL (Ti)

図3 Tiプレート上でのCHL細胞コロニー試験

表1 Tiプレート上でのCHL細胞小核試験

		micronucleus (%)							
		(μg/mL)	MN-2	MN-3	Multi-MN	MN-total	MP	Multi-N	TF-N
Control	48 h		0.6	0.2	0.1	0.9	3.0	0.0	0.0
Ti	48 h		0.8	0.2	0.2	1.2	2.2	0.2	0.2
Control	48 h	MMC 0.2	7.4	2.8	16.1	26.3	1.8	3.4	1.8
Ti	48 h	MMC 0.2	5.6	1.7	16.0	23.3	1.7	2.9	3.0

MN-2; 1/10-1/3 micronucleus, MN-3; 1/3-1/2 micronucleus, Multi-MN; multi micronucleus, MP; metaphase, Multi-N; multi nucleus, TF-N; transformed nucleus

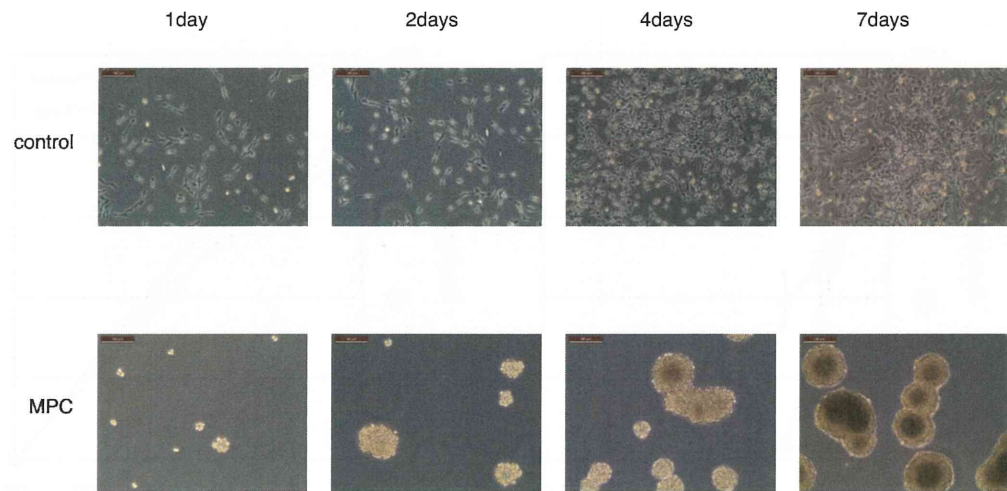


図4 MPCポリマーコートプレート上で培養したCHL細胞

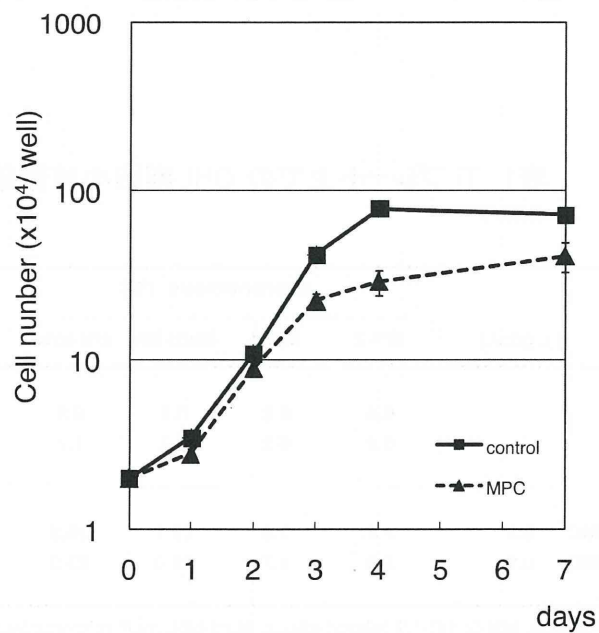


図5 MPCポリマーコートプレート上で培養したCHL細胞の増殖曲線

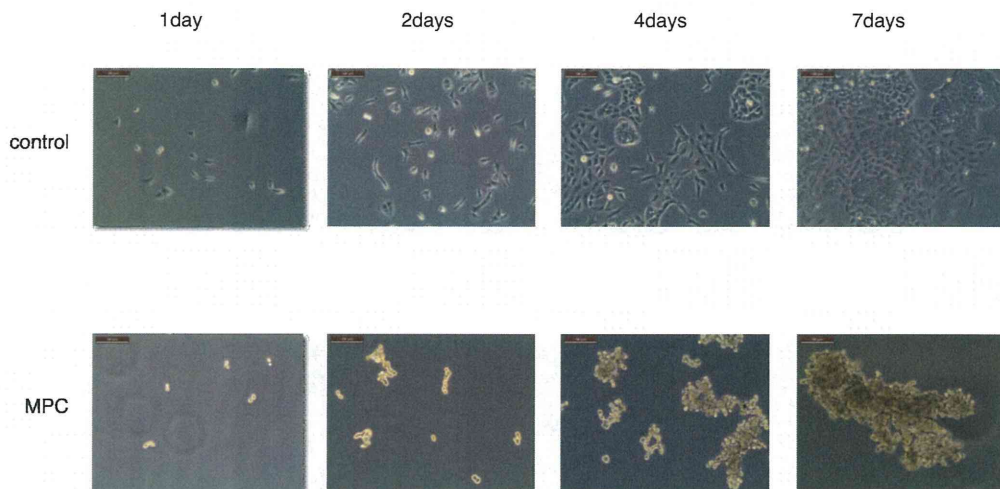


図6 MPCポリマーコートプレート上で培養したA549細胞

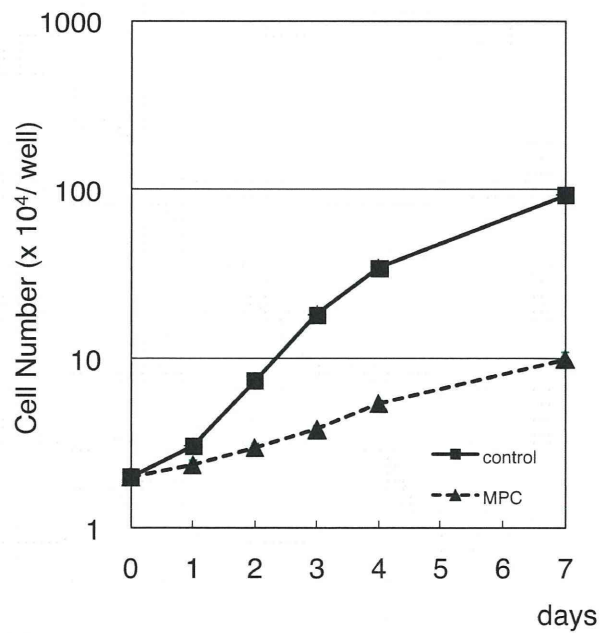


図7 MPCポリマーコートプレート上で培養したA549細胞の増殖曲線

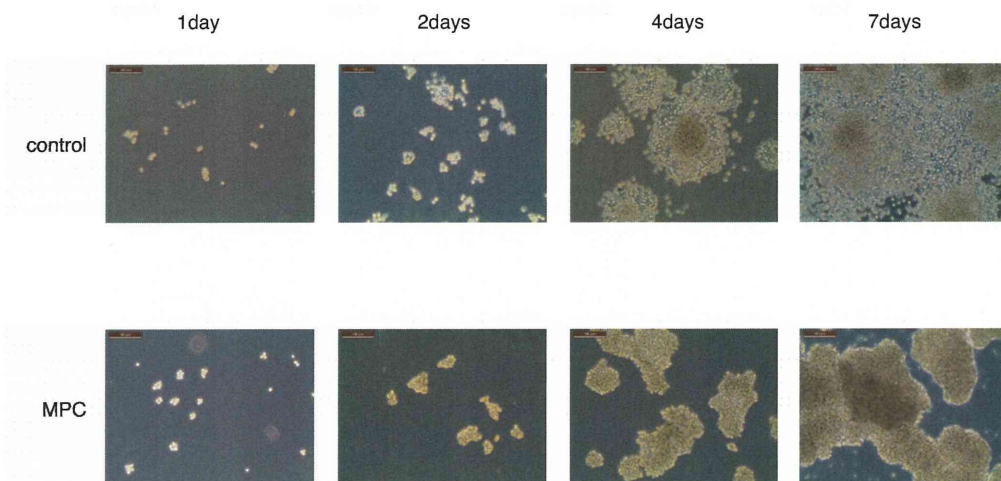


図8 MPCポリマーコートプレート上で培養したRAW264.7細胞

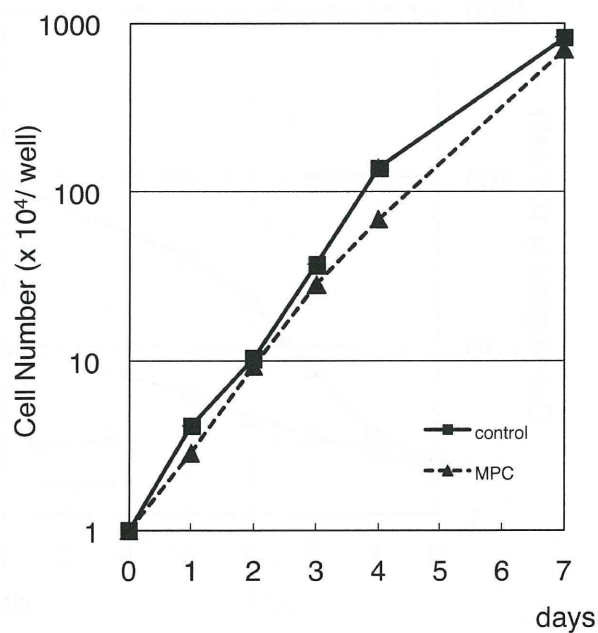
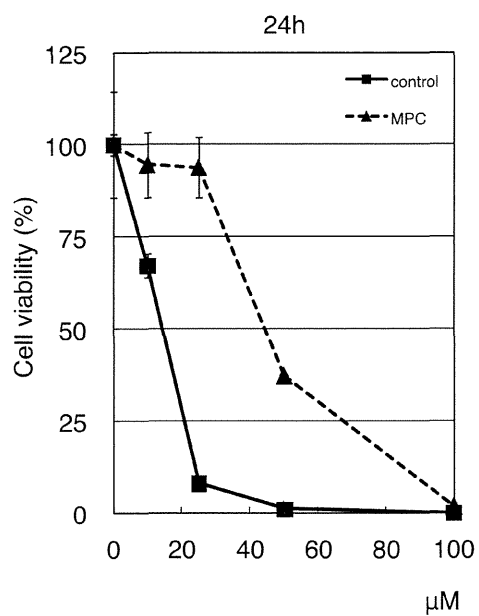
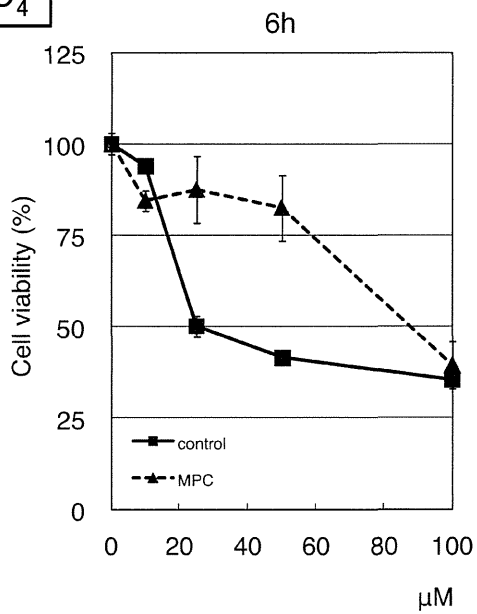


図9 MPCポリマーコートプレート上で培養したRAW264.7細胞の増殖曲線

CdSO₄



ZnO

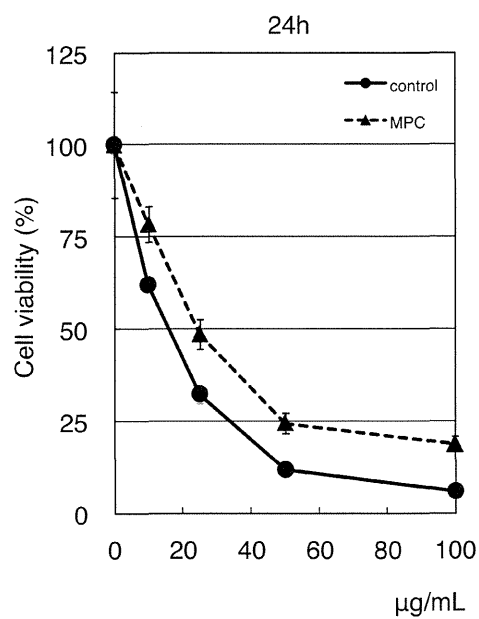
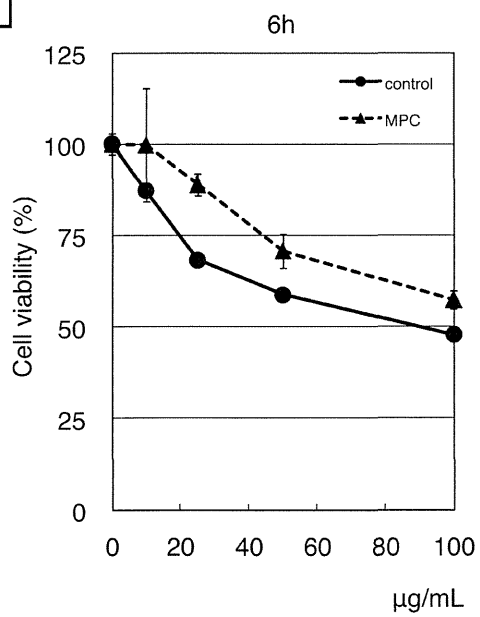
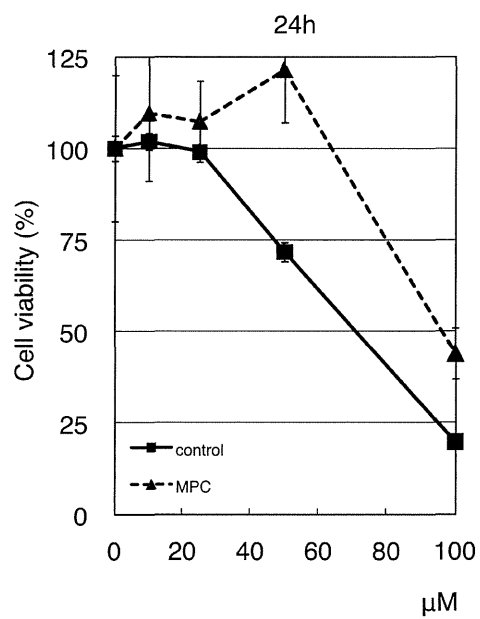
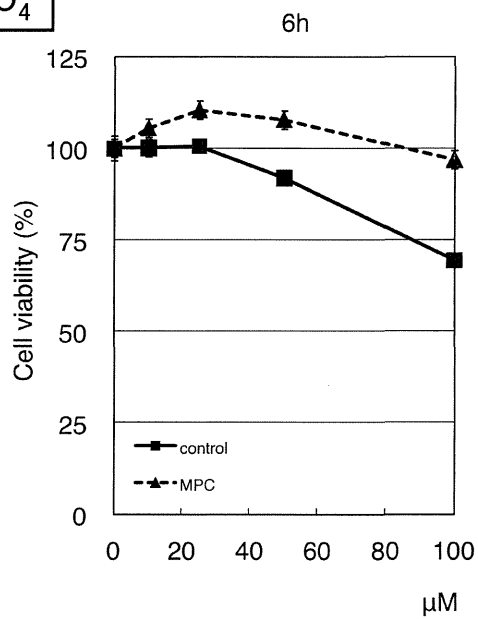


図10 CHL細胞のCdSO₄, ZnOに対する細胞毒性の比較

CdSO₄



ZnO

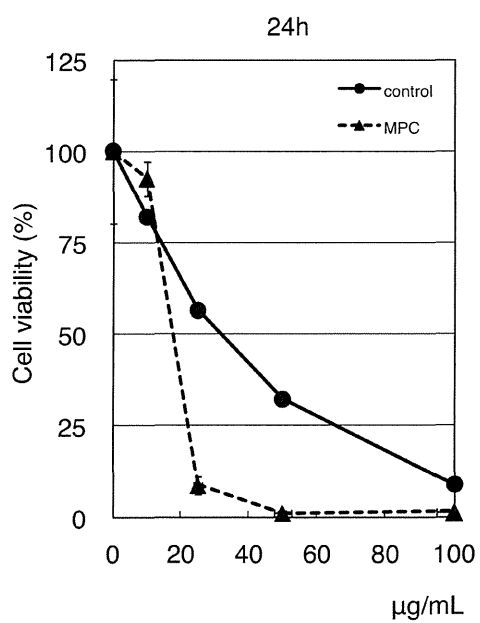
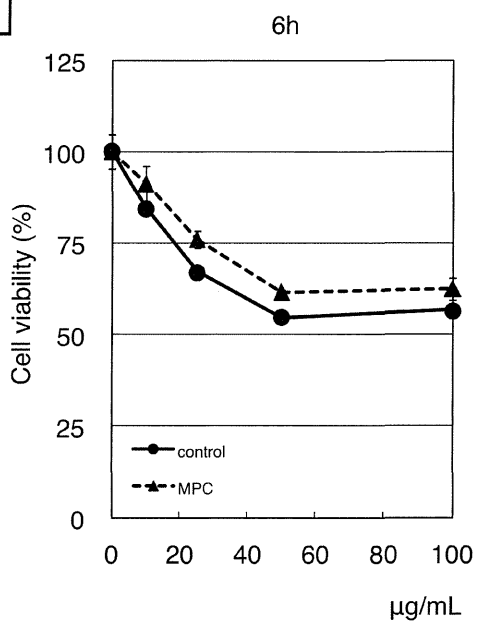
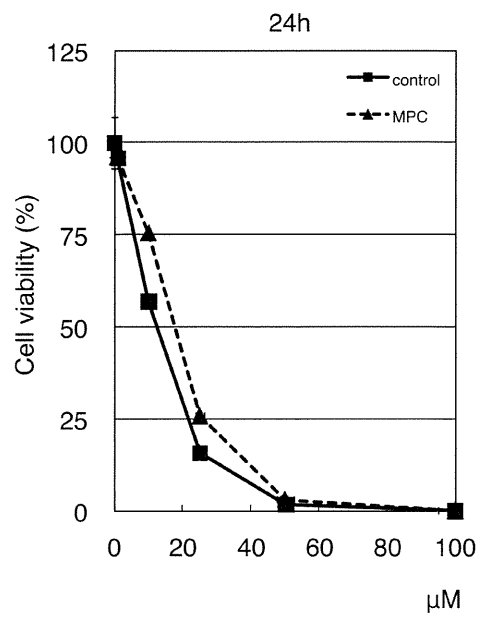
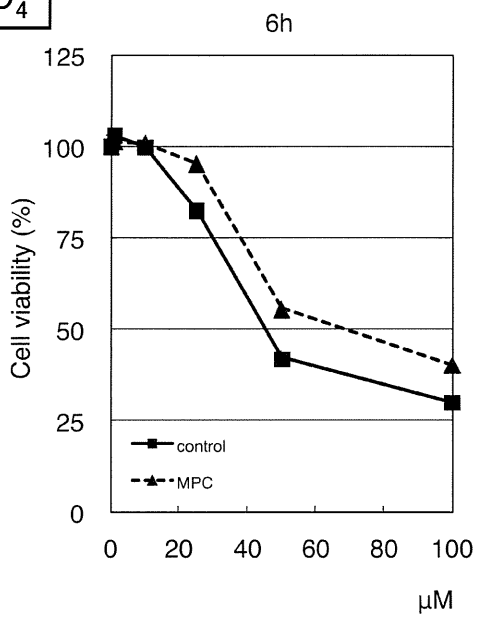


図11 A549細胞のCdSO₄, ZnOに対する細胞毒性の比較

CdSO₄



ZnO

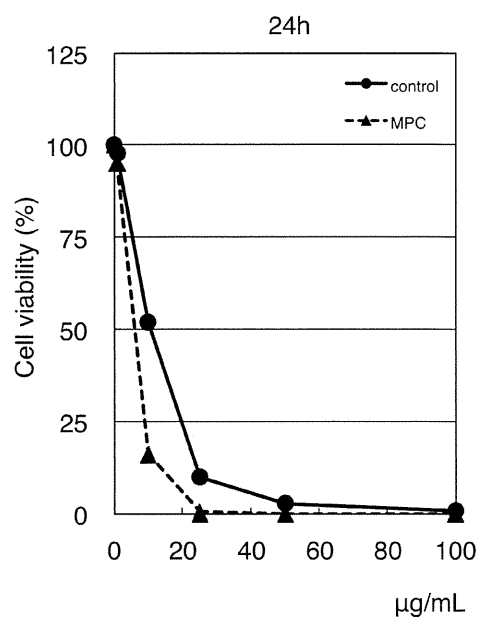
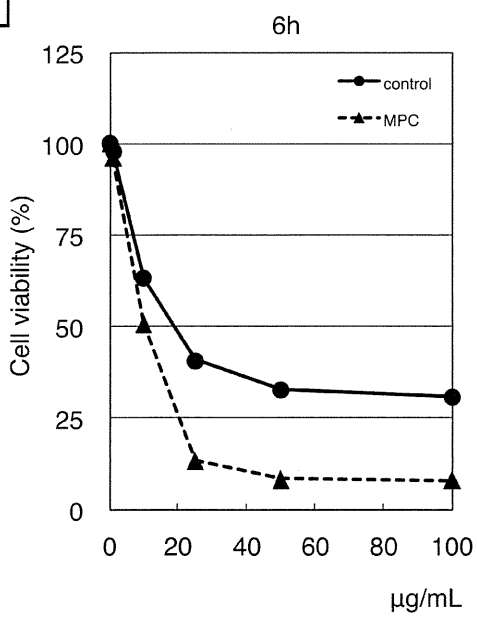


図12 RAW264.7細胞のCdSO₄, ZnOに対する細胞毒性の比較

表2 MPCポリマーコートプレート上における細胞毒性の比較

Cell line	CdSO ₄ IC ₅₀ (μ M) (24h)		ZnO IC ₅₀ (μ g/mL) (24h)	
	Control	MPC	Control	MPC
CHL	14.4	<< 44.3	16.0	< 24.3
A549	70.9	<< 96.1	31.6	>> 17.6
RAW 264.7	12.5	< 17.7	10.7	> 6.1

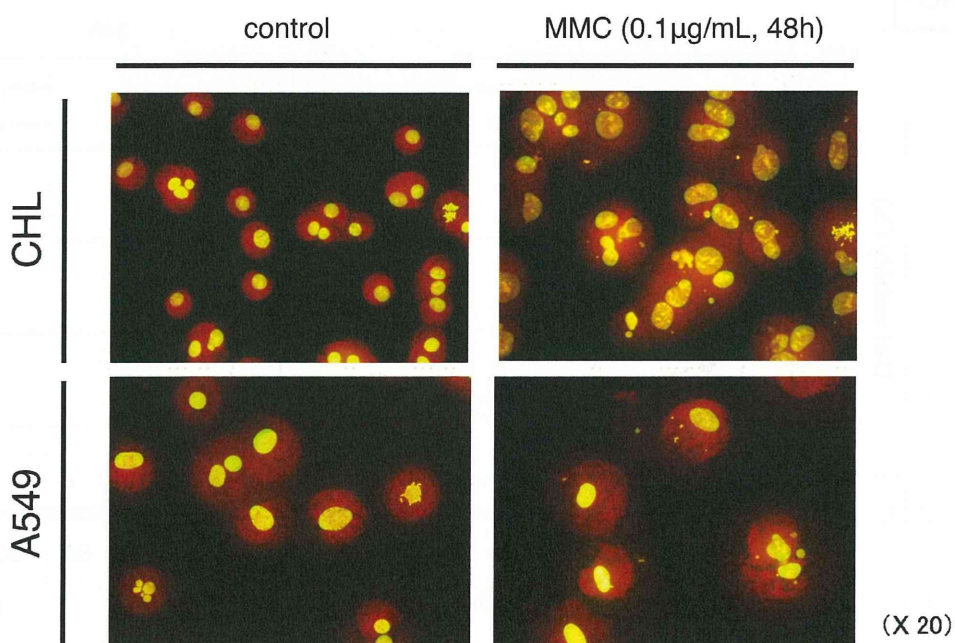


図13 CHL細胞及びA549細胞による小核試験