

ある SC5b-9 では、C5a 同様、HEMA/MEA シートにおいて MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白産生の減少が観察された (図 11)。また、2 時間インキュベーション後、シート無しの場合でも、 $\beta$ -TG、C3a 同様、SC5b-9 の値が増加していた。補体系の活性化産物 C3a、C5a、SC5b-9 において、陽性対照シート、HEMA/MEA シートにより、C5a、SC5b-9 の結果は似ていたが、C3a の結果は行なっており、同じ補体系の活性化マーカーでも異なる結果が得られることが示された。また、補体系の活性化産物 C3a、C5a、SC5b-9 共に、陽性対照として用いた PET、PC シートによる値の上昇が、5 種類の HEMA/MEA シートの値に比較して高いという結果は観察されなかった。

### 3. 新規材料による血液適合性試験

PHEMA、PMEA、PMe3A、PEOEVE、PTHFVE をコートしたシートを用いて血液適合性試験を行い、溶血性試験、血液凝固系 TAT 及び血小板活性化  $\beta$ -TG を測定した。試験は 4 回実施し、その平均を求めた。表 3 に溶血試験の結果を示した。いずれのシートも溶血率は 2% 以下であり、溶血性なしと判定された。ABS 540 nm においても ABS 576 nm と同様の結果が得られた (data not shown)。次に、凍結保存しておいた血液サンプルを用いて、ELISA 法により TAT、 $\beta$ -TG を測定したところ、TAT の値は、PET、PHEMA、PC、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順に値が小さくなっていった (図 12)。 $\beta$ -TG の値は、PC、PET、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順で (図 13)、陽性対照のシート以外の 5 種類のシートの結果は、TAT、 $\beta$ -TG 共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE の順で、PMe3A と PTHFVE、PMEA と PEOEVE の値は同程度であった。

### D. 考察

本邦においては、平成 24 年 3 月に「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」(薬食機発 0301 第 20 号 通知) が発出され、現在はこの通知を元に、生物学的安全性試験が行われている。その「第 8 部 血液適合性試験」においては、血液適合性試験の標準的な評価項目として、血栓形成、血液凝固、血小板、血液学的項目、補体系の 5 つの試験項目が挙げられており、それぞれの試験項目について標準的な評価項目が挙げられている (図 1) 血液凝固の TAT、フィブリノペプチド A (FPA)、血小板の  $\beta$ -TG、血小板第 4 因子 (PF4)、補体系の C3a、C5a、SC5b-9 の測定には免疫検定法 (ELISA) が推奨されるため、使用できる動物種が限定される。これらの項目に対する ELISA キットは、ヒトの臨床検査用が開発されているものが多いことから、ヒトの血液による試験系の設定が必要になる。標準的な評価項目として挙げられている因子や活性化産物が分解しやすいなど、半減期が短いことから、それぞれの測定項目に合わせたサンプリングが必要となった。血小板因子測定用のサンプルにおいては、血中の組織因子が影響することから、臨床の測定サンプルにおいては、初めの 2 mL を捨てた後に 4.5 mL の血液をサンプリングする様指示があることから、今回の試験の実施においても、まず、初めの 3-4 mL を別の注射筒で取ってから試験用の採血を行った。この組織因子の影響を確認するため、組織因子を含む血液 6 mL を、同様に 2 時間インキュベーションし、 $\beta$ -TG の値を測定したが、試験用に最初の 6 mL を取った後採取した血液 (100mL 程度) による結果と差はなかった (data not shown)。このことから、少なくとも、この in vitro 評価系において  $\beta$ -TG を比較する場合において

は、組織因子の影響は受けないと考えられた。

### 1. PCシートを用いた血液適合性試験法についての検討

陽性対照としてPCシートを用い、インキュベーション時の基礎的な実験条件について検討を行なった。インキュベーションチューブの素材は、PET、PP及びPP-low protein bind tubeについて比較し、インキュベーション時間は、1、2、4時間について検討した。その結果、PP low-bind チューブを用いることにより、陰性対照（シート無し）の値が低く、陽性対照シートとの差が観察しやすいと考えられた。また、インキュベーション時間については2時間が適当であると考えられた。補体系最終活性化産物のSC5b-9については、シートの有無による差が観察されなかったことから、補体系の他の評価項目であるC3a、C5aについても検討することにした

### 2. 混合比の異なるHEMA/MEAシートを用いた血液適合性試験

混合比の異なるHEMA/MEAランダム共重合体をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、溶血性及び、TAT、 $\beta$ -TG、C3a、C5a、SC5b-9の各マーカー量を測定した結果、TAT、 $\beta$ -TG、C5a、SC5b-9では、HEMA/MEAシートにおけるMEA量の増加に伴って、マーカー量の減少が観察され、図6に示した各シートの接触角の結果とも良く相関していた。これら結果は、MEAがHEMAに比べてより血液適合性に優れているという性質と一致していた。TAT、 $\beta$ -TGでは、陰性対照（シート無し）に比べて、陽性対照シート（PET、PC）におけるマーカー量の増加が観察されていた。補体系マーカー（C3a、C5a、SC5b-9）に関しては、陰性対照（シート無

し）に比べて、陽性対照シート（PET、PC）で値の差が殆どなく、HEMA/MEAシートとの差も観察され難かった。以上より、高分子材料の血液適合性の評価においては、TAT、 $\beta$ -TG活性を指標とするのが適している可能性が示唆された。

$\beta$ -TGの測定結果では、HEMA/MEAシートにおいて、H50M50、H25M75はPMEAに比べて $\beta$ -TG量が減少していたことから、混合比を変化させることにより、生体適合性/血液適合性を更に向上できる可能性が考えられた。各材料の特性により、血液適合性における生体応答への影響が異なると考えられることから、メカニズムを踏まえた解析が期待される。

### 3. 新規材料による血液適合性試験

本年度の研究で用いた、新規材料PMe3A、PEOEVE、PTHFVEは、いずれもPMEAの類似体である。PMe3Aは、2-[2-(2-methoxyethoxy)ethoxy]ethyl acrylateとn-butyl acrylateの共重合体(30:70 mol%)で、PEOEVE、PTHFVEは共に、PMEAのエステル部分がエーテルになったvinyl ether構造を有している。PMe3A、PEOEVE、PTHFVEに対して血液適合性試験を実施し、TAT及び $\beta$ -TGの活性化について検討したところ、両マーカー共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVEの順に小さくなっており、PMe3AとPTHFVE、PMEAとPEOEVEの値は同程度であった。本試験の結果から推測される、血液適合性はPEOEVE = PMEA > PTHFVE > PMe3A > PHEMAの順である。PMEAとPEOEVEが同程度に低いという結果は、PEOEVEにおいてPMEA同様、中間水が観察され、PMEAとPEOEVEの血小板粘着量は同程度に低いという、H25年度の本研究班の田中らの報告と、良く一致した。

本年度の研究において、補体系の C3a、C5a、SC5b-9 において HEMA/MEA シートに対する挙動が異なっていたが、血液凝固の標準的な評価項目としては TAT の他に FPA、血小板においては  $\beta$ -TG の他に PF4 も挙げられており、これらの項目が同程度に評価されるか確認しておく必要があると思われる。また、先に補体系による評価について述べたが、今回実施した *in vitro* 評価系では、15 mL のチューブに被験シートと血液 6 mL を入れ、緩やかに振盪しており、インキュベーション中、血液は空気と接触している。 $\beta$ -TG 及び補体系マーカー C3a、C5a、SC5b-9 は、2 時間のインキュベーション後、いずれもシート無しにおいて、値が上昇していた。シート無しにおいて値が上昇していても、それをバックグラウンドとして被験材料による差をみることができれば問題ないと思われるが、今回用いた、陽性対照シート、HEMA/MEA シートでは、その差として検出することは困難で、 $\beta$ -TG では、被験シートによる値が、シート無しに比べて低い場合もあった。これらの結果が、空気との接触によるものであるかは判断できないが可能性の一つとして考えられるため、空気相の影響等についての検討も含め、今後更に、各試験法の特長、妥当性について総合的に検証に向けて、基礎的データを収集する必要があると考えられる。

本研究班においては、プロテオミクス解析を利用して、材料表面吸着蛋白質を指標とした新規血液適合性マーカーの探索が進められ、幾つかの候補蛋白質が見つかってきている。これらの材料側からの評価マーカーが、*in vitro* の血液適合性試験において、血液側からも追跡できれば、評価法の効率化、新規評価手法開発に繋がるのが期待できる。

## E. 結論

本研究において、

1. 陽性対照 PC シートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 $\beta$ -TG、SC5b-9 の各マーカー蛋白質量を測定した結果、インキュベーション時間に応じて、TAT、 $\beta$ -TG、SC5b-9 量の増加が観察された。TAT、 $\beta$ -TG では PC シートの共存により、マーカー蛋白質量の増加が観察された。
  2. 混合比の異なる HEMA/MEA ランダム共重合体をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 $\beta$ -TG、C3a、C5a、SC5b-9 の各マーカー蛋白質量を測定した結果、TAT、 $\beta$ -TG、C5a、SC5b-9 では、HEMA/MEA シートにおける MEA 量の増加に伴うマーカー蛋白質産生の減少が観察され、更に、TAT、 $\beta$ -TG では、陽性対照シート (PET、PC) におけるマーカー蛋白質産生の増加が観察された。以上より、高分子材料の血液適合性の評価においては、補体系のマーカー (C3a、C5a、SC5b-9) は適さず、TAT、 $\beta$ -TG を指標とするのが適している可能性が示された。
  3. 新規材料 PMe3A、PEOEVE、PTHFVE をコートしたシートを用いて血液適合性試験を実施し、TAT、 $\beta$ -TG の各マーカー蛋白質量を測定した結果、両マーカー共に、PHEMA、PMe3A、PTHFVE、PMEA、PEOEVE 順に値が小さくなっており、血液適合性は PEOEVE = PMEA > PTHFVE > PMe3A > PHEMA の順であると推察された。
- 今後も引き続き生体適合性の異なる高分子材料を用いて血液適合性試験を実施し、各試験法の特長、妥当性について総合的に検証を進め、評価法の効率化、新規評価手法開発に向けての基礎的データを収集する予定である。

本研究の遂行にあたり、血液適合性試験の実施方法についてご指導いただきました、

一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所 毒性学研究室の新藤智子先生に感謝致します。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) Miyajima-Tabata A., Kato R., Komoriya K., Niimi S.: Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)

2) 宮島敦子、小森谷薫、田中賢、比留間瞳、加藤玲子、新見伸吾：血液適合性試験における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2014.11）

3) 加藤玲子、齋島由二、福井千恵、比留間瞳、澤田留美、宮島敦子、新見伸吾：ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性マーカーの探索、第 36 回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2014.11）

4) Miyajima-Tabata A., Kawakami T., Komoriya K., Kato R., Niimi S., Isama K Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)

## 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

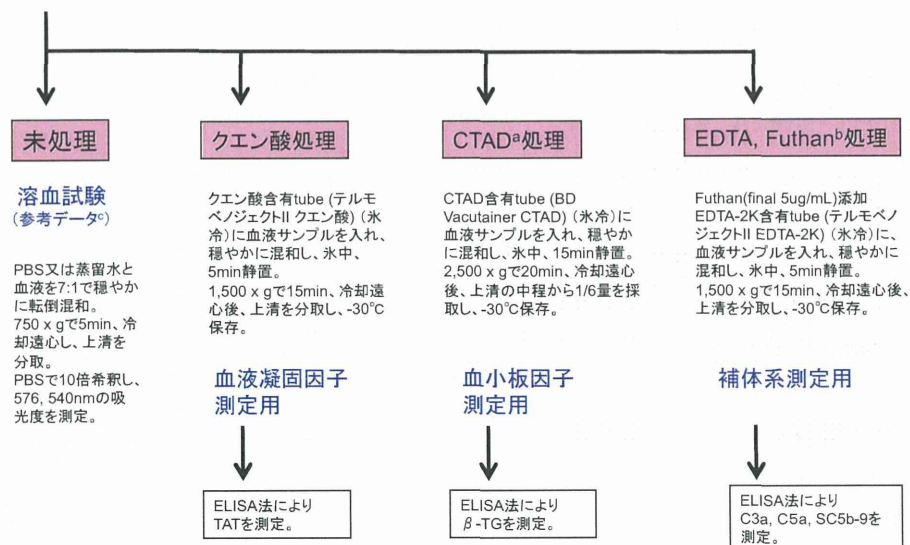
なし

試験項目		評価項目
1	血栓形成	付着物/ 付着状態
2	血液凝固	トロンビン-抗トロンビン複合体 (TAT)
		フィブリノペプチドA (FPA)
		部分トロンボプラスチン時間 (PTT)
3	血小板	血小板数
		血小板放出因子 ( $\beta$ -トロンボグロブリン ( $\beta$ -TG))
		血小板第4因子 (PF4)
4	血液学的項目	全血算 (CBC)
		溶血
5	補体系	補体活性化産物 (C3a)
		補体活性化産物 (C5a)
		補体活性化産物 (SC5b-9)

「医療機器の製造販売承認申請等に必要な生物学的安全性評価の基本的考え方について」  
(薬食機発0301第20号 平成24年3月1日)より

図1 血液適合性試験における標準的な評価項目

ヒト全血(ヘパリン2 U/mLを含む)と被験試料(6 cm<sup>2</sup> /1mL血液)を、37°C、2時間、緩やかに振盪(60 rpm)後、各試験項目に応じて血液をサンプリング。



<sup>a</sup> CTAD: citrate, theophylline, adenosine and dipyridamole (血小板刺激抑制)

<sup>b</sup> Futhan: Nafamostat Mesilate (補体分解阻害剤)

<sup>c</sup> ASTM法ではクエン酸処理血、NIH法ではシュウ酸処理血、MHLW法では脱繊維血、先に血液を希釈後、接触試験

図2 血液適合性試験の実施方法の概略

表1 血液適合性試験の試験条件の検討 溶血性

Incubation tube	Time	PC samples	ABS (576nm) mean		溶血率 (%)
			PBS	DDW	
PP	0 time	-	0.033	0.809	
PET	1h	-	0.026	0.835	
	1h	+	0.028	0.865	0.19
	2h	-	0.028	0.857	
	2h	+	0.029	0.863	0.12
	4h	-	0.030	0.884	
	4h	+	0.031	0.824	0.12
PP	1h	-	0.027	0.866	
	1h	+	0.025	0.870	0.00
	2h	-	0.030	0.833	
	2h	+	0.030	0.957	0.00
	4h	-	0.029	0.933	
	4h	+	0.030	0.903	0.06
PP-low bind	1h	-	0.027	0.881	
	1h	+	0.025	0.897	0.00
	2h	-	0.032	0.891	
	2h	+	0.033	0.906	0.06
	4h	-	0.032	0.815	
	4h	+	0.030	0.877	0.00

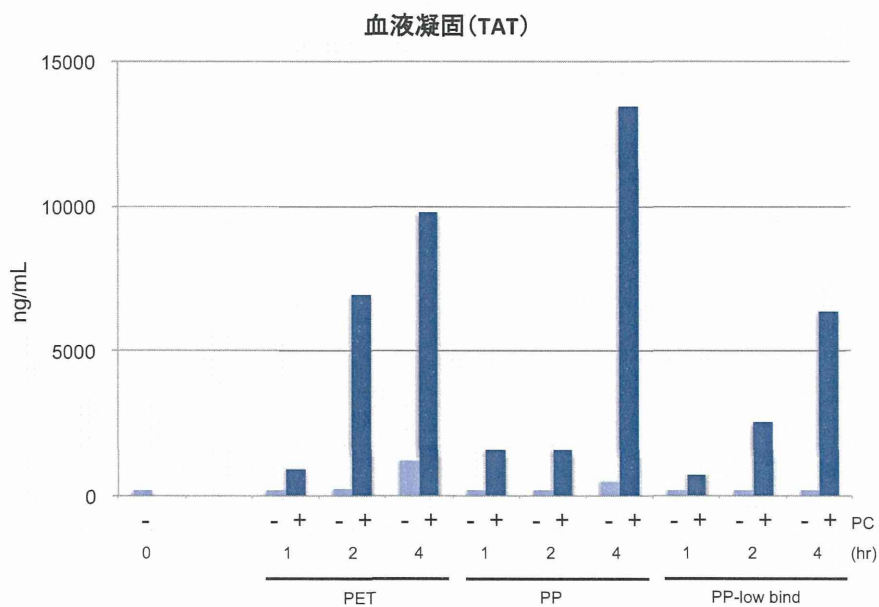


図3 血液適合性試験の試験条件の検討 血液凝固系(TAT)

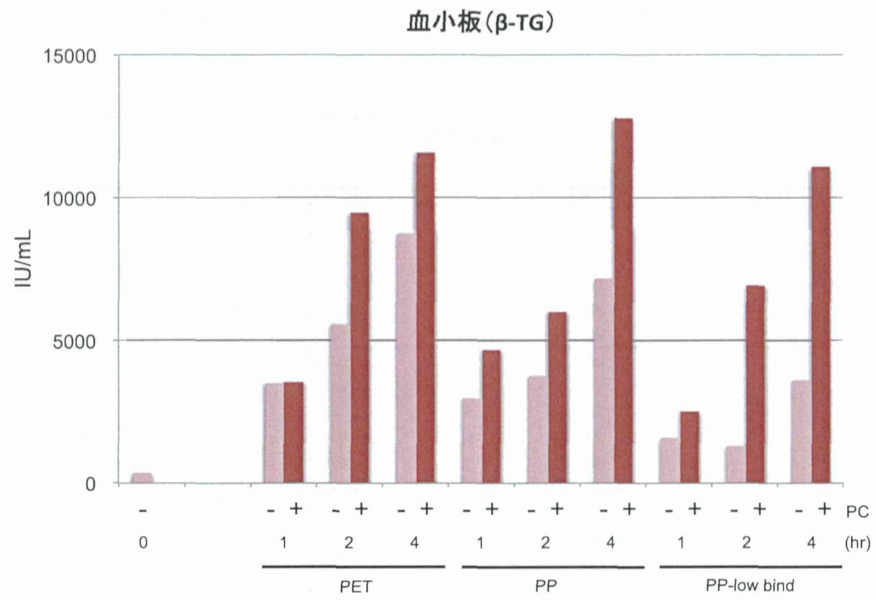


図4 血液適合性試験の試験条件の検討 血小板( $\beta$ -TG)

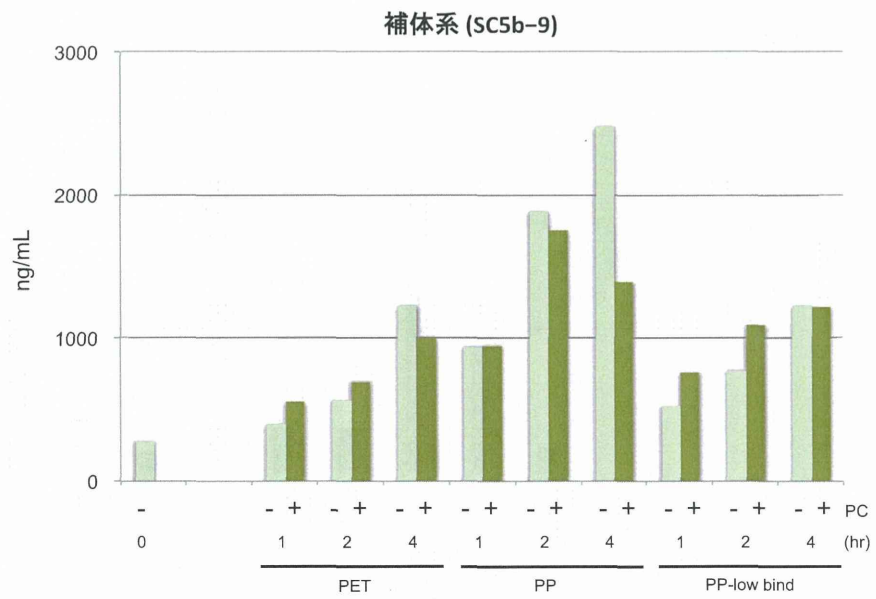


図5 血液適合性試験の試験条件の検討 補体系(SC5b-9)

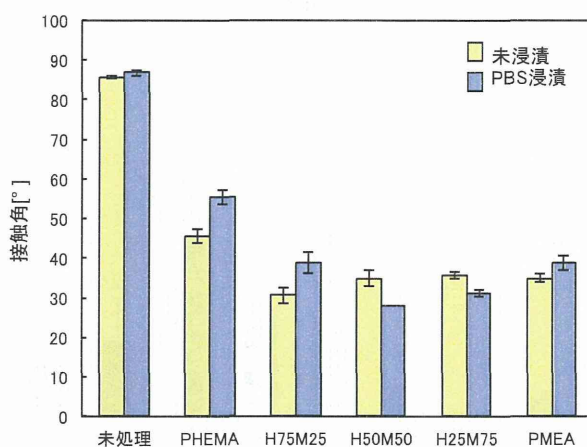


図6 混合比の異なるHEMA/MEAコポリマーコートPCシートの接触角

表2 混合比の異なるHEMA/MEAを用いた血液適合性試験における溶血率

	ABS (576nm) (Mean ± SD)		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.031 ± 0.003	0.839 ± 0.080	
no sheet	0.032 ± 0.001	0.923 ± 0.033	
PET	0.032 ± 0.002		0.06 ± 0.12
PC	0.033 ± 0.002		0.11 ± 0.07
PHEMA	0.036 ± 0.002		0.42 ± 0.27
M25H75	0.035 ± 0.002		0.35 ± 0.13
M50H50	0.034 ± 0.002		0.24 ± 0.14
M75H25	0.034 ± 0.002		0.13 ± 0.11
PMEA	0.033 ± 0.001		0.28 ± 0.26



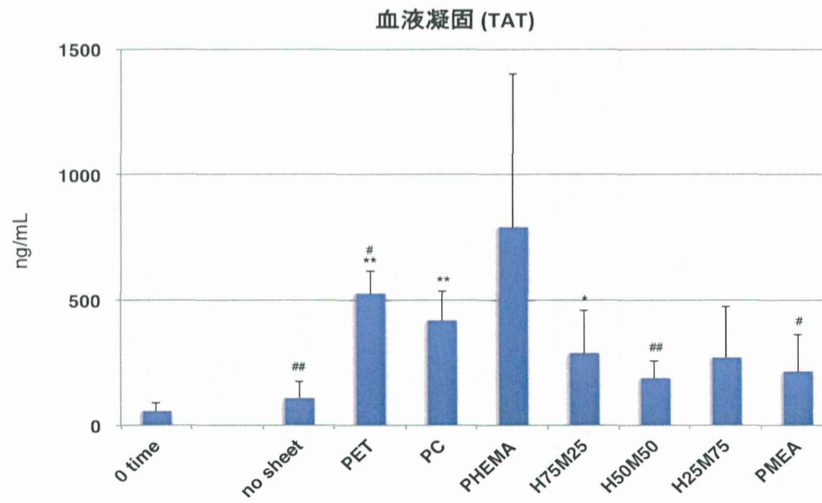


図7 混合比の異なるHEMA/MEAによる血液凝固系(TAT)の活性化

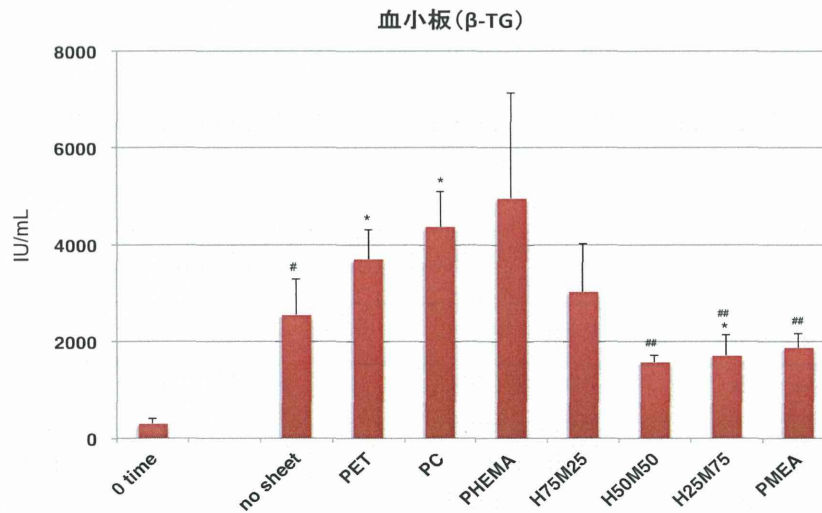


図8 混合比の異なるHEMA/MEAによる血小板(β-TG)の活性化

Valures are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and PC are shown as #p < 0.05, ##p < 0.01.

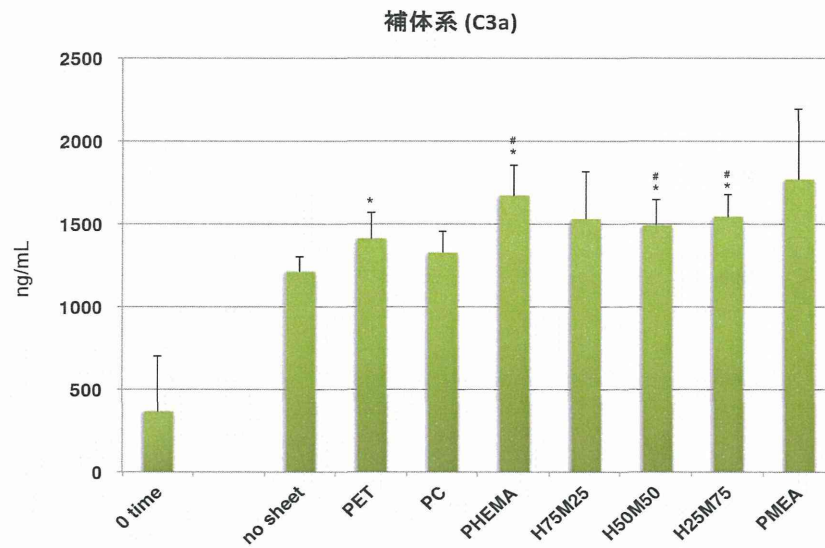


図9 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C3a)の活性化

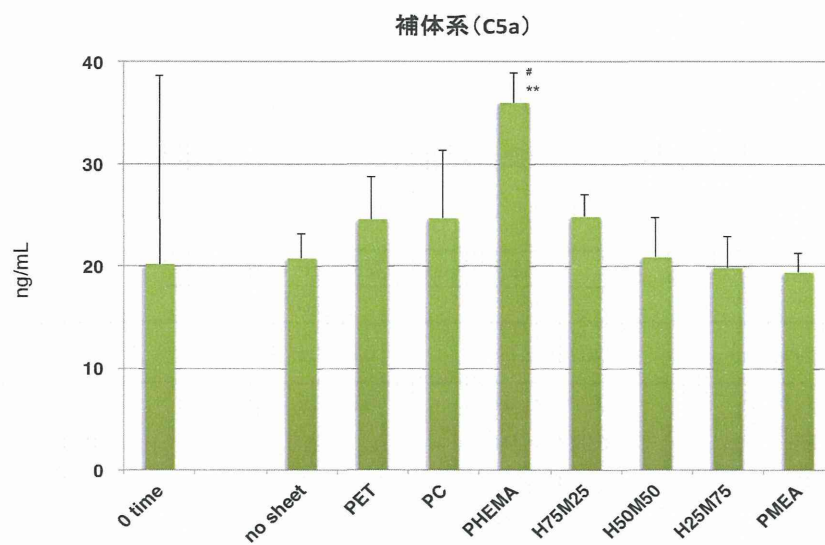


図10 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C5a)の活性化

Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and PC are shown as # $p < 0.05$ .

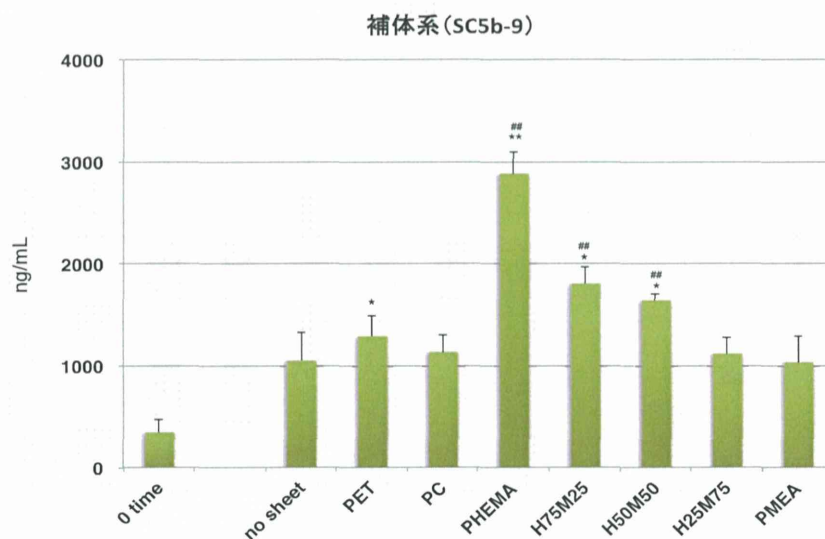


図11 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(SC5b-9)の活性化

Values are expressed as mean ± SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 and PC are shown as ##p < 0.01.

表3 新規材料を用いた血液適合性試験における溶血率

	ABS (576nm) (Mean ± SD)		溶血率 (%)
	PBS	DDW	
0 time (no sheet)	0.033 ± 0.004	0.915 ± 0.053	
no sheet	0.029 ± 0.003	0.916 ± 0.061	
PET	0.027 ± 0.004		0.09 ± 0.19
PC	0.028 ± 0.005		0.06 ± 0.12
PHEMA	0.030 ± 0.003		0.15 ± 0.23
PMEA	0.030 ± 0.002		0.19 ± 0.28
PMe3A	0.029 ± 0.004		0.10 ± 0.12
PEOEVE	0.030 ± 0.005		0.21 ± 0.35
PTHFVE	0.031 ± 0.003		0.24 ± 0.28

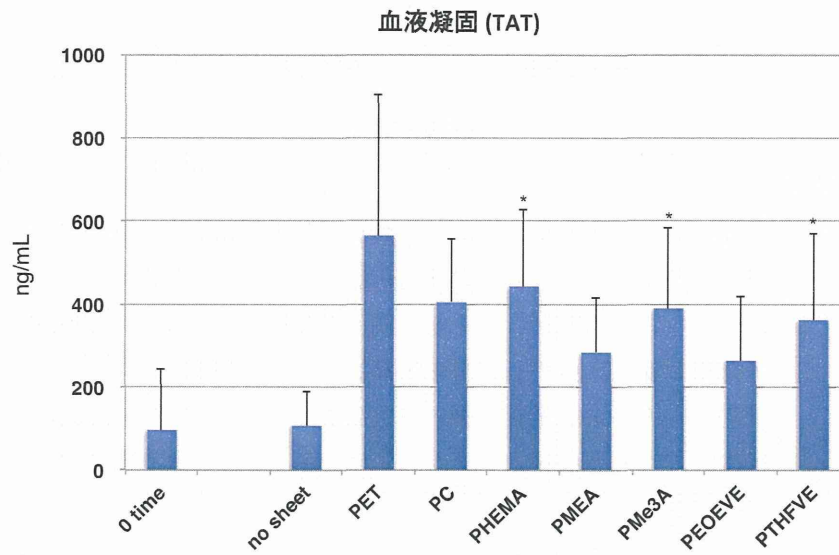


図12 新規材料による血液凝固系(TAT)の活性化評価

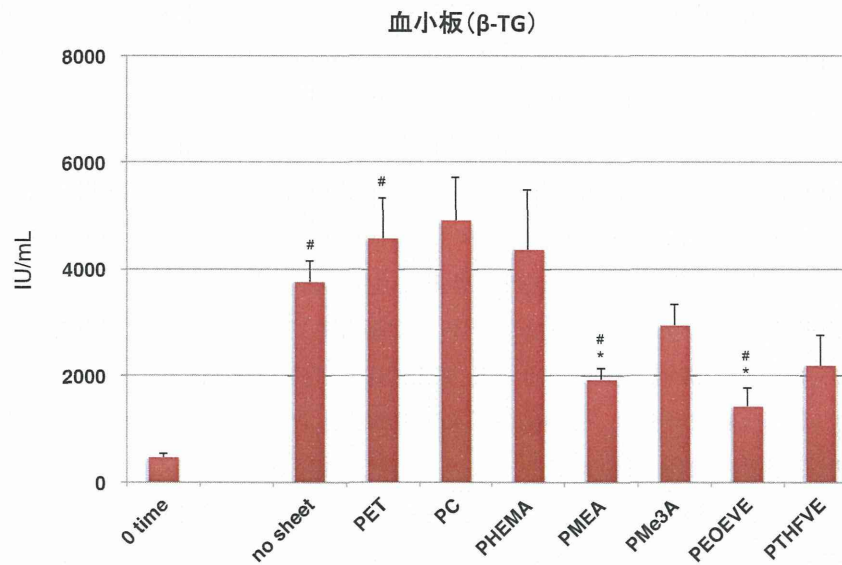


図13 新規材料による血小板( $\beta$ -TG)の活性化評価

Values are expressed as mean  $\pm$  SD (n=4). Significant differences versus no sheet are shown as \*p < 0.05 and PC are shown as #p < 0.05.

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  
細胞内タンパク質発現解析を利用した医用材料の血液適合性評価に関する研究

研究代表者 新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部  
研究分担者 加藤玲子 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部  
研究協力者 薮島由二 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部  
研究協力者 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 比留間瞳 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部  
研究協力者 小森谷薫 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部

研究要旨

近年、材料表面構造の違いが、その表面上へのタンパク質を始めとした種々の分子の吸着挙動の違いを生じさせ、その結果、細胞の接着や活性化などに影響を与えることが示唆されてきている。本研究では、材料表面構造の違いが、細胞の特性にどのような影響を与えるか、タンパク質発現の観点から検討することを目的としている。そのために、表面特性の異なる材料上で細胞を培養し、相互にタンパク質の発現の違いを比較しつつ、材料の生物学的特性との相関性を検討してきた。昨年度は、ヒト単球細胞である THP-1 を用いたタンパク質比較発現解析の結果より、基材を PMEA もしくは PHEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応などを制御できることを示した。様々な血栓性の疾患において、血液凝固と炎症反応は関連性があることが示されてきていることから、今年度は THP-1 の活性化表面マーカー (CD54:ICAM-1, CD86: B7-2) の発現に着目して、PMEA と PHEMA に加え、分子構造から血液適合性が高いと予測される新規の生体適合高分子材料である P<sub>Me</sub>3A、PTHFVE および PEOEVE でコーティングしたシート上で培養した THP-1 間で比較検討を行った。その結果、培養 24 時間後で、細胞培養用シャーレ (TCPS) を対照とした時、基材であるポリカーボネート (PC)、P<sub>Me</sub>3A コーティング PC および PEOEVE コーティング PC において、CD54 の発現量から相対蛍光強度 (RFI) を算出したところ、約 2 倍以上であった。それに対して、PHEMA、PMEA、PTHFVE コーティング PC 上で培養すると約 0.9~1.5 倍であった。一方、CD86 は PC を含む評価したすべてのコーティング PC において、TCPS とほぼ同等の発現強度であった。さらに炎症系サイトカインである IL-8 の培養上清中の量を比較したとこと、PHEMA が対照と同等である以外は、いずれも対照の 3 倍以上の発現がみられ、P<sub>Me</sub>3A >> PEOEVE >> PC =PMEA>PTHFVE の順に高発現していた。これらの結果から、今回検討した生体適合高分子材料は、THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PHEMA < PTHFVE ≤ PMEA << PEOEVE << P<sub>Me</sub>3A であることが示された。

## A. 研究目的

人工血管や人工透析膜、人工心臓やカテーテルといった医療機器は、血液と接触することから血液適合性に優れていることが必要とされる。一般に、医療機器が生体内に埋植されると、直ちに材料表面にイオンや水が吸着し、そのあと生体内のタンパク質や多糖が吸着してくる。表面特性が異なれば、結合する生体分子の種類や量も異なると考えられる。一方、細胞は直接材料表面に結合するのではなく、吸着し変性したタンパク質などを介して材料と相互作用するため、材料の表面構造の違いが細胞自身の挙動に影響をおよぼし、これが生体適合性の違いを生み出す一因になると考えられる。PMEA および PHEMA は他の類似ポリマーに比べてタンパク質の吸着が少なく、生体適合性が高いことから、それぞれに様々な埋植医療機器のコーティングやソフトコンタクトレンズなどの材料として広く用いられている。そこで昨年度、血液適合性に優れている PMEA と、高い生体適合性を有する PHEMA が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかをタンパク質発現に焦点をおいて検討した。その結果、基材を PMEA もしくは PHEMA でコーティングすることで、血液凝固だけでなく炎症反応なども制御できる可能性が示唆された。さらに接着因子の発現も未処理の基材と比較して抑制されていた。これらのことより、未処理の基材上で THP-1 が活性化されている可能性が考えられた。そこで、今年度は THP-1 の活性化表面マーカーである CD54 (ICAM-1) と CD86 (B7-2) の発現に着目して、PMEA と PHEMA に加え、新規の生体適合高分子材料である PMe3A、PTHFVE および PEOEVE

でコーティングしたシート上で培養した THP-1 間で比較検討行ったので報告する。

## B. 研究方法

### 1. 材料

シート：厚さ 0.1 mm, 径 35 mm の菅原工業製 Pre-coated ポリカーボネートシート (ポリカーボネート 薄物) (以下 PC と表記)  
ポリマー溶液： Poly (2-methoxyethyl acrylate) (PMEA), Poly (2-hydroxy ethyl methacrylate)(PHEMA), Poly [2-{2-(2-methoxy-ethoxy) ethoxy} ethyl acrylate-co-butyl acrylate] (PMe3A), Poly (tetrahydrofurfuryl vinyl ether) (PTHFVE), Poly (2-ethoxy-ethyl vinyl ether) (PEOEVE)

### 2. ポリマーコーティングシートの作製

KYOWARIKEN 製スピンコータ (K-359SD-1 SPINNER) の設置台上に PTFE メンブレンフィルターをのせ、その上にメタノール溶液で洗浄した未処理 PC を置き、4,000 rpm で回しながら、その中央に 1 w/v%メタノール溶液の PMEA もしくは PHEMA を 100  $\mu$ l 滴下し、4,000 rpm, 10 sec にてコーティングした後、乾燥させた後、再度同条件に計二回コーティングしたシートを実験に用いた。

### 3. 細胞培養

THP-1(Human acute monocytic leukemia : 急性単核球性白血病由来)は、10%FBS/0.05mM メルカプトエタノール含有 RPMI1640 中で二週間以上、前培養したものを使用した。6 well, cell culture plate (TCPS; Costar)上、もしくは TCPS に各コーティングシートを静置した上に RPMI1640 を入れ、一度その培地を抜き取った後、各コーティ

ングシート上に THP-1 を  $5 \times 10^5$  細胞/2 ml で播種し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37°Cで一～二日間培養した。

#### 4. 細胞形態・シート表面観察

位相差倒立顕微鏡 (LEICA DM IL; Laica) を用いて観察した。

#### 5. THP-1 の活性化マーカー測定 (Human Cell Line Activation Test(h-CLAT 法)の改変)

各コーティングシート上で培養した細胞を 24 時間後、48 時間後に 2 ml のチューブに回収し、遠心後、1 ml の冷 FACS Buffer (F.B.:0.1% BSA 含有 PBS)に懸濁し、2 回洗浄後、600  $\mu$ l の 0.01% ヒト  $\gamma$  グロブリン含有 PBS に懸濁し、4°Cで 15 分間静置して FcR のブロックを行った。ブロック後、遠心して、上清を除き、120  $\mu$ l の F.B.に懸濁し、1.5 ml チューブ 3 本に 40  $\mu$ l ずつ分注し、各抗体希釈液を 10  $\mu$ l ずつ添加して、氷温上で 30 分間静置した。抗体は FITC ラベルされた、1 : anti-human CD54 (clone: 6.5B5, DAKO 社) 3/5 希釈、2 : anti-human CD86 (clone: Fun-1, BD PharMingen 社) 3/10 希釈、3 : アイソタイプコントロールとして mouse IgG1 (clone; DAK-G01, DAKO 社) 3/10 希釈を使用した。抗体染色後、遠心して、上清を除き、200  $\mu$ l の F.B.に懸濁し、2 回洗浄後、400  $\mu$ l の F.B.に懸濁し、2.5  $\mu$ g/ml の PI を添加して、5 分後に Flow Cytometry (FACS Calibur Cell Quest, Becton Dickinson 社) で解析した。死細胞は Propidium Iodide (PI)によって染め分け、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞生存率は FACS で取り込んだ細胞中、PI で陰性だった割合より算出し、生存率 50%以

上のものだけ解析に用いた。

CD54 及び CD86 発現の評価法としては、以下の式に基づいた相対蛍光強度(Relative fluorescence intensity (RFI))を用いた。

$RFI(\%) = \frac{\text{各シート上で培養した細胞の MFI} - \text{各シート上で培養した細胞の isotype control の MFI}}{\text{TCPS 上で培養した細胞の MFI} - \text{TCPS 上で培養した細胞の isotype control の MFI}} \times 100$

MFI = Geometric Mean fluorescence intensity

#### 6. IL-8 の測定

培養上清中の IL-8 の量は、ELISA kit Human IL-8 (invitrogen 社) を用いて、マニュアルに則して測定した。

#### 7. 倫理面への配慮

研究に用いた THP-1 はヒューマンサイエンス研究資源バンクより購入しており、倫理面の問題はないと考えられる。

### C. 研究結果

#### (1) 播種後の細胞の形状とシート表面

播種して 24 時間後での THP-1 の形態を図 1-1 に示す。いずれも顕微鏡観察下においては TCPS 上で培養した THP-1 と同様にほぼ球形で浮遊していた。コーティングしたシート表面は、PHEMA 以外で亀裂やまだら模様が観察された。播種して 48 時間後での THP-1 の形態は未処理の PC 上で培養した THP-1 は、ほとんどが球形で浮遊していたが、中には扁平で PC 上に接着している細胞も混在していた。(図 1-2) コーティングした PC 上で培養した THP-1 にも、若干接着している細胞が観察されたが、大きな形状の変化はみられなかった。

## (2) 細胞生存率

播種 24 時間後および 48 時間後とも、PMe3A と PEOEVE の両者で 85-87%であったが、これは他のシートが対照の TCPS を含め 90%前後の生存率であったのと、有意差はなかった。(図 2)

## (3) CD54 および CD86 の RFI (%)

CD54 および CD86 の RFI (%)の 2 回の試験結果を図 3-1 (播種 24 時間後)と図 3-2 (48 時間後)に示す。TCPS を対照とした時、CD86 は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、2 倍を超えたものはなかった。一方、CD54 では、播種 24 時間後において、未処理 PC、PMEA、PMe3A、および PEOEVE で平均 2 倍以上になっていた。播種 48 時間後になると、PMe3A で 4 倍以上、PEOEVE で 3 倍以上であった。さらに PC だけでなく、PMEA と PTHFVE も 2 倍前後まで上がっていた。一方、PHEMA は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、TCPS とほぼ同等であった。

## (4) 培養上清中の IL-8 量

培養 24 時間後および 48 時間後で TCPS と同等であったのは PHEMA のみであった。他のシートでは、24 時間後、対照と比較して、PMe3A:約 12 倍、PEOEVE:約 7 倍、PC:約 4 倍、PMEA:約 4 倍、PTHFVE:約 3 倍であった。48 時間後も傾向は大きく変わらなかったが、さらに TCPS より高い発現がみられ、PMe3A:約 49 倍、PEOEVE:約 23 倍、PC:約 10 倍、PMEA:約 13 倍、PTHFVE:約 8 倍であった。(図 4)

## D. 考察

本研究では、表面構造の違いが THP-1 に与える影響を細胞のタンパク質発現レベルで検討している。今年度は、通常の培養皿である TCPS を対照として、基材 (PC シート) および様々な生体適合性高分子でコーティングした PC シートの上で培養した THP-1 の活性化マーカーである CD54 および CD86 の発現比較解析を行った。

まず、播種して 24 時間後および 48 時間後の THP-1 を顕微鏡観察したところ、未処理の PC 上では、シートの接触面に接着している細胞や接着はしていないが突起を出している状態の細胞が一部観察された。TCPS 上では接触面で接着はせずに物理的に触れている状態であった。これは昨年度の 48 時間の観察と一致していた。もともと THP-1 は未刺激では浮遊している細胞であるが、ホルボールエステルやリポポリサッカロイドなどで刺激されるとマクロファージ様の細胞に変化し接着するようになる。つまり、THP-1 は未処理の PC 表面から何らかの刺激を受けた可能性が考えられる。一方、各コーティングシート上で培養した THP-1 は PC と比べて少ないながら一部接着している細胞も観察されたが、ほとんどが TCPS と同様に接触面で触れている状態であった。これは各高分子コーティングにより、表面構造が変わったこと、さらに表面上への吸着タンパク質の種類や量が変わったこと (H26 年度本報告書分担研究者 薮島の項、研究結果(2)高分子材料の蛋白質吸着挙動を参照) が影響していると考えられる。

一方、敗血症性播種性血管内凝固症候群は全身の血管内で血液凝固が起こり、その結果、微小血栓が多発する症候群であるが、その凝固活性化のイニシエーターとしては、



病原体由来のエンドトキシン、炎症性のサイトカインや HMGB1 などが考えられている。これらの因子が単球・マクロファージや血管内皮細胞の表面に組織因子を発現させ、凝固反応が開始する。さらにアテローム血栓性疾患の発症にも炎症が重要な役割を果たすことが明らかにされてきており、炎症性サイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-1、IL-8、IL-12、IL-18)などが、アテロームプラーク形成、プラーク破綻や血栓形成に関与する分子として同定されている。このように、炎症と血液凝固(血栓形成)の間には関連があることが知られてきている。THP-1 は単球系の細胞であることから、接触面の表面構造の違いによる影響から、何らかの刺激を受け炎症反応と類似した活性化状態になる可能性が考えられた。一方、THP-1 を利用した、遅延型炎症性反応(感作性)を調べる *in vitro* 試験法として、国内の化粧品会社により、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法)が開発されている。この方法は THP-1 の培養液中に化学物質のような被験物質を培養添加し、THP-1 の活性化マーカーである CD54 と CD86 の発現を指標として、被験物質が感作性を評価する試験法である。今回は、表面構造が THP-1 に与える影響を検討するため、ポリマー溶液自身や抽出物の添加ではなく、各ポリマーでコーティングされた表面上で THP-1 を培養し、CD54 と CD86 の発現強度と、培養上清中の IL-8 量を測定した。通常の h-CLAT では培養 24 時間後のみで判定しているが、培養条件の一部が化学物質の場合と異なるため、培養 24 時間後と 48 時間後で検討した。その結果、CD86 は播種 24 時間後でも 48 時間後でも、2 倍を超えたものはなかった。一方、

CD54 は播種 24 時間後において、未処理 PC、PMe3A および PEOEVE が平均 2 倍以上になっていた。中でも PMe3A は 2 回とも、基材である処理 PC よりも発現強度が高かった。さらに 48 時間後では、PHEMA が TCPS と同等であるのに対して、それ以外のシートでは発現強度が 2 倍を超えていた。h-CLAT 法では培養時間は 24 時間で、対照の RFI を 100 とした時に、CD54 RFI = 200, CD86 RFI = 150 を陽性基準値、結果判定は 3 回中 2 回の試験において、CD54 もしくは CD86 のいずれかの陽性基準値を超えた場合を陽性と判定と定めてある。しかしながら、化粧品のような化学物質ではなく、今回の様に材料表面構造が細胞におよぼす影響を評価する場合は、培養時間および陽性基準値や判定法について検討する必要があると思われる。次に、炎症性サイトカインである IL-8 の培養上清中の量を測定したところ、播種 24 時間後において、CD54 の 48 時間後の発現強度パターンと類似した産生パターンがみられ、48 時間後の IL-8 の産生量は、パターンを増強していた。他の炎症性のサイトカイン量を検討することや、タイムコースを追った確認が必要であるが、より早期の培養上清中の IL-8 の量を測定することで、CD54 の発現強度を推測できる可能性が考えられた。また CD54 発現強度測定においても、皮膚に長時間直接接する化粧品や薬剤とは異なり、これらの生体適合性高分子材料が血液に接触する医療機器に使用される際は、血液が循環している環境下であり、その中に含まれる単球などは、同じ細胞が常に接触していることはないと考えられることから、今後、培養時間について検討する必要があると思われる。

今回の結果から、1：基材である PC を含め、検討した生体適合高分子材料で CD86 の発現を顕著に上げるものはなかった。

2：PHEMA の表面構造は THP-1 を活性化することはなく、他の高分子材料では THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PTHFVE  $\leq$  PMEA  $\ll$  PEOEVE  $\ll$  PMe3A であることが示された。これは吸着タンパク質挙動から判断した血液適合性が良い順番 (H26 年度、本報告書分担研究者 薮島の項を参照) PMEA=PTHEVE>PEOEVE>PHEMA>>PMe3A とは PMEA と PHEMA の位置付けが異なるが、新規生体適合高分子材料に関しては、同様の傾向がみられている。体内で血液に触れる環境下では、血漿タンパク質だけでなく、単球を始めとした、血液細胞との相互作用もあることから、両方の結果を加味して判定を検討する必要もあると思われる。

#### E. 結論

今回検討した生体適合高分子材料は、THP-1 の活性化に与える影響が小さい順に PHEMA < PTHFVE  $\leq$  PMEA  $\ll$  PEOEVE  $\ll$  PMe3A であることが示された。

#### F. 研究発表

##### 学会発表

##### 1.学会発表

1) Atsuko Miyajima-Tabata, Tsuyoshi Kawakami, Kaoru Komoriya, Reiko Kato, Shingo Niimi, Kazuo Isama. Effects of metal oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune response in THP-1 cells. The 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology

(San Diego, 2015.3)

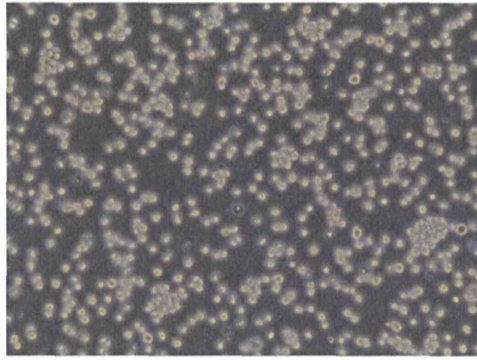
2) 加藤玲子, 薮島由二, 福井千恵, 比留間瞳, 澤田留美, 宮島敦子, 新見伸吾. 「ヒト単球系細胞の蛋白質発現挙動に基づく医用材料の血液適合性評価マーカの探索」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京, 2014.11)

3) 宮島敦子, 小森谷薫, 田中賢, 加藤玲子, 新見伸吾. 「血液適合性評価における HEMA/MEA ランダム共重合体材料に対する蛋白質マーカーの挙動について」. 第 36 回日本バイオマテリアル学会(東京, 2014.11)

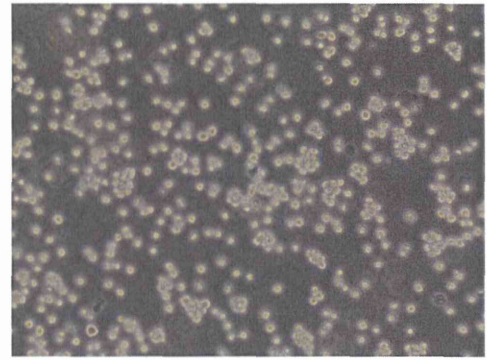
4) 加藤玲子, 佐藤正人, 岡田恵里, 阿久津英憲, 小久保舞美, 河毛知子, 宮島敦子, 梅澤明弘, 持田譲治, 新見伸吾. 「多指症組織由来細胞の免疫制御能の解析」. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会 (2014.10)

5) Atsuko Miyajima-Tabata, Reiko Kato, Kaoru Komoriya, Shingo Niimi. Cellular response of THP-1 cells cultured on the polymer biomaterials. Eurotox 2014 (Edinburgh, 2014.9)

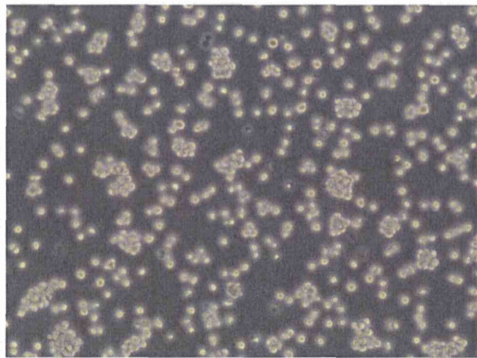
6) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎. 「酸化金属ナノマテリアルに対する THP-1 細胞の細胞応答」. 第 41 回日本毒性学会 (神戸, 2014.7)



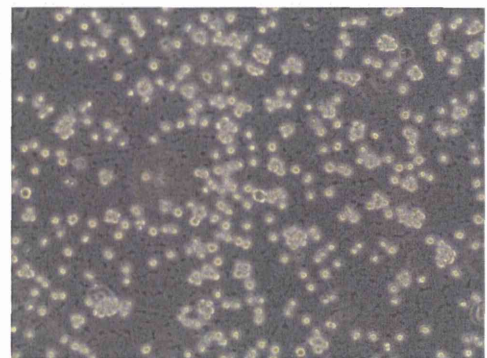
TCPS



PC



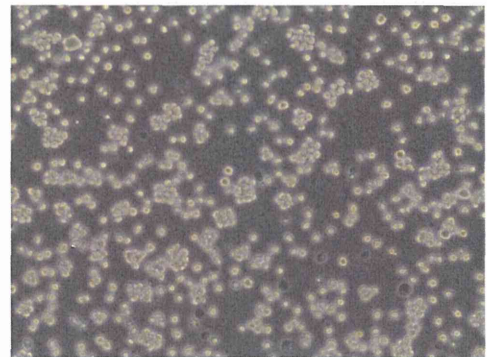
PHEMA



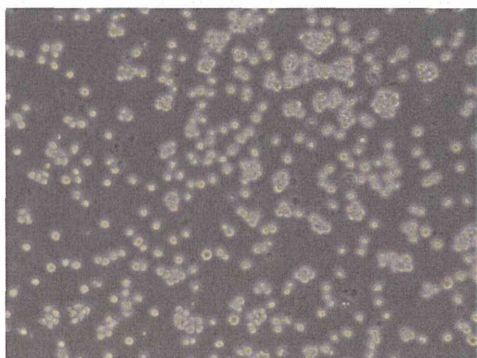
PMEA



PMe3A



PTHFVE

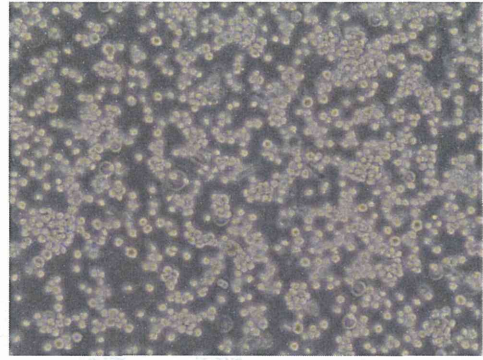


PEOEVE

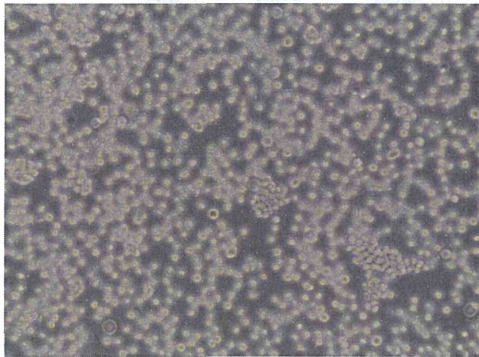
図1-1: 播種24時間後のTHP-1形態



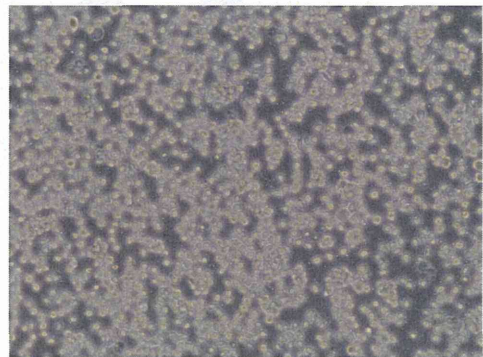
TCPS



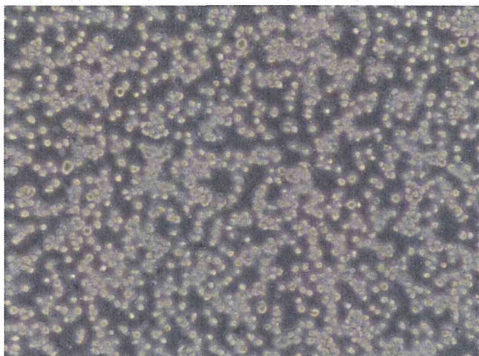
PC



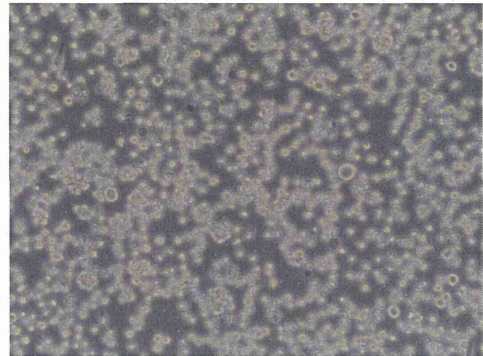
PHEMA



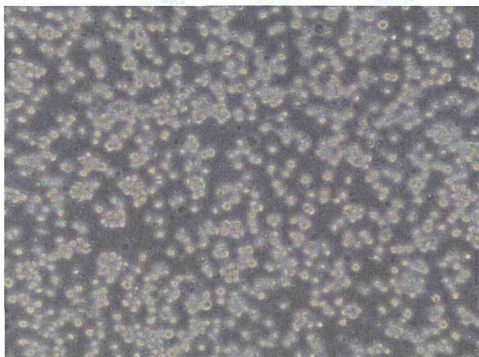
PMEVA



PMe3A



PTHFVE



PEOEVE

図1-2: 播種48時間後のTHP-1形態