

- |  |  |
|--|--|
| <p>5) 宮島敦子、加藤玲子、小森谷薫、新見伸吾：生体適合性高分子医用材料上で培養したマクロファージ系細胞の細胞応答、第35回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）</p> <p>6) 加藤玲子、薮島由二、福井千恵、澤田留美、宮島敦子、新見伸吾：生体親和性高分子材料によるヒト骨髄由来間葉系幹細胞の機能への影響（2）：タンパク質発現の網羅的解析、第35回日本バイオマテリアル学会大会（船堀、2013.11）</p> <p>7) 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：多指症由来軟骨細胞の同種 T 細胞におよぼす影響、第27回日本軟骨代謝学会（京都、2014.2）</p> <p>8) 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)</p> <p>9) 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）</p> <p>10) 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）</p> <p>11) 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 54nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Diego, 2015.3)</p> | <p>（予定を含む。）</p> <p>1. 特許取得<br/>なし</p> <p>2. 実用新案登録<br/>なし</p> <p>3. その他<br/>なし</p> |
|--|--|

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

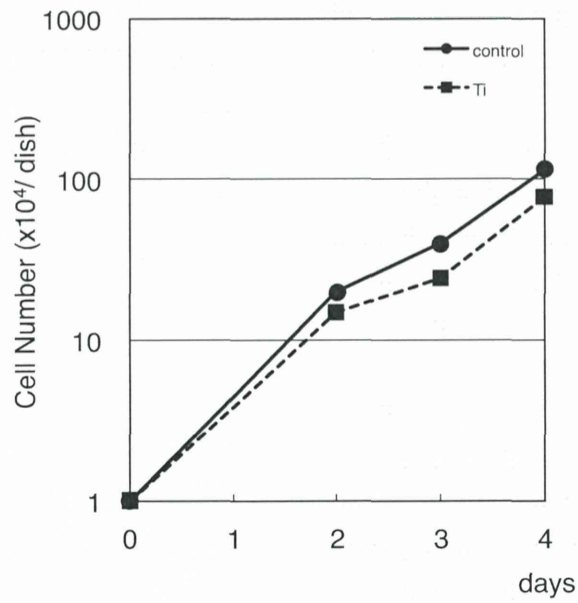


図1 Ti プレート上で培養したCHL細胞の増殖曲線

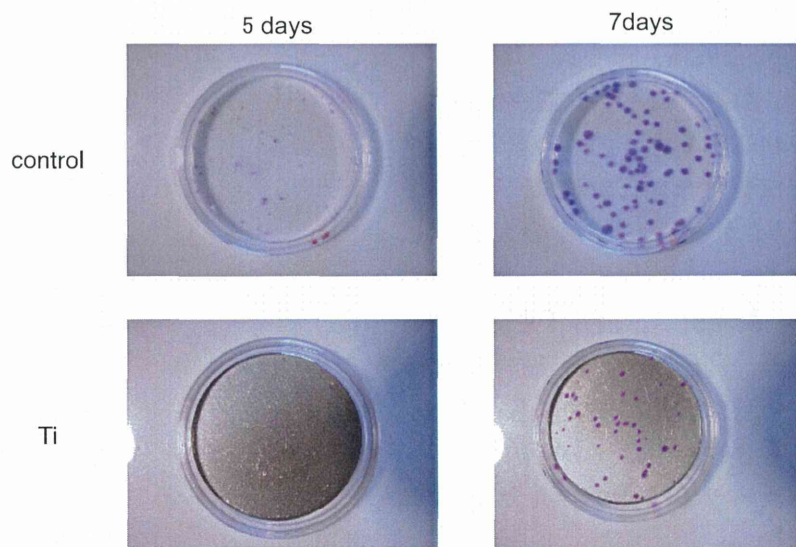
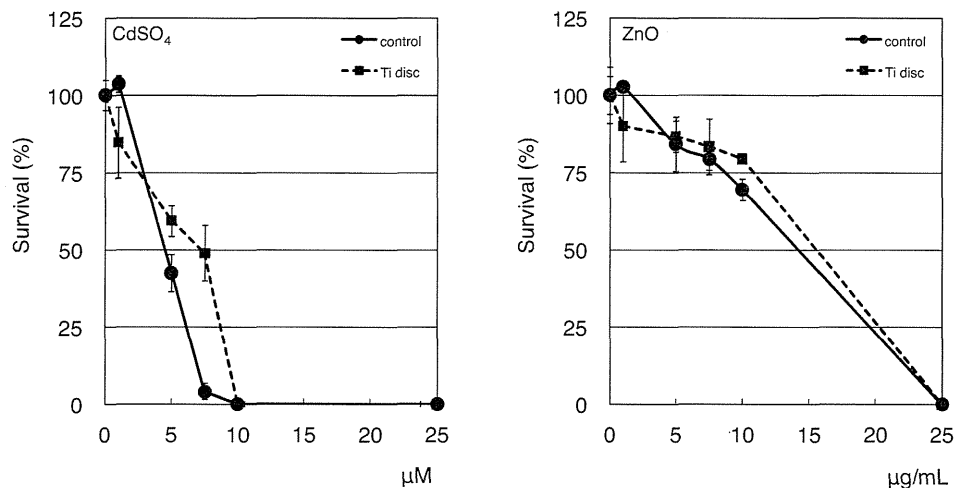


図2 Ti プレート上でのCHL細胞コロニー試験



IC<sub>50</sub> (Colony formation)  
 CdSO<sub>4</sub>; 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

			(μg/mL)	micronucleus (%)				MP	Multi-N	TF-N
				MN-2	MN-3	Multi-MN	MN-total			
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

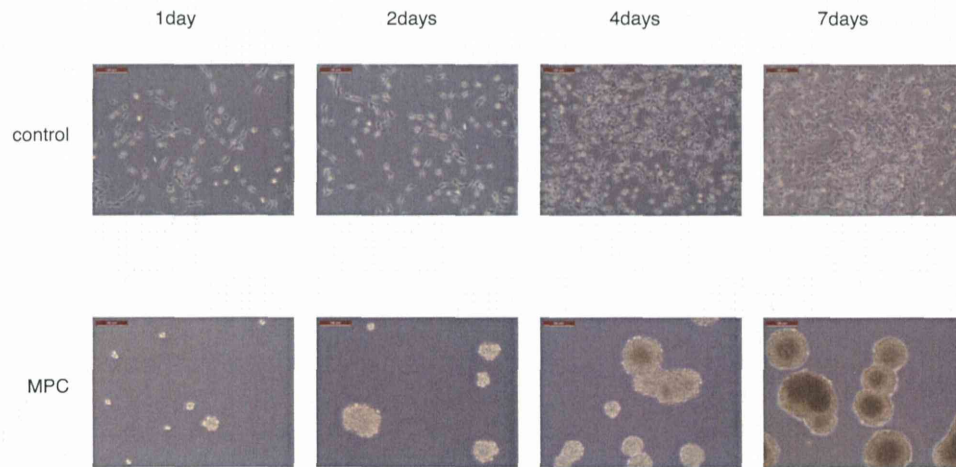


図4 MPCポリマーコートプレート上で培養したCHL細胞

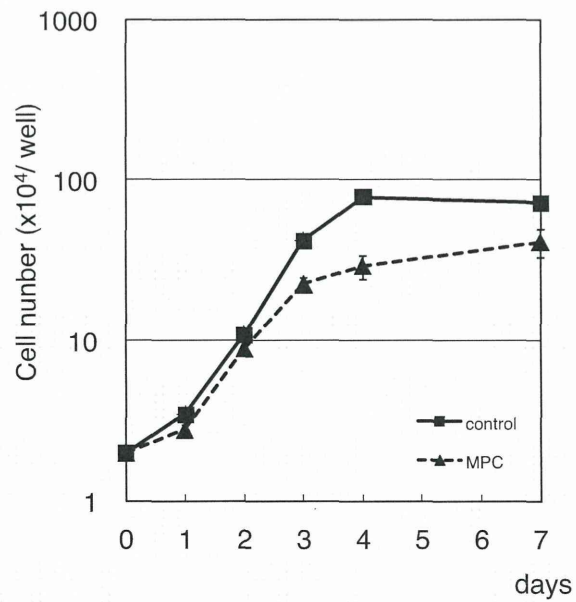


図5 MPCポリマーコートプレート上で培養したCHL細胞の増殖曲線

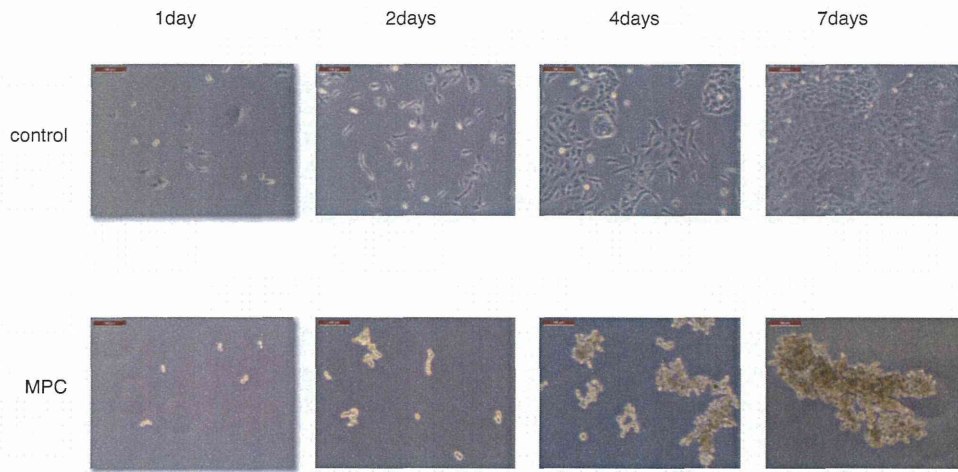


図6 MPCポリマーコートプレート上で培養したA549細胞

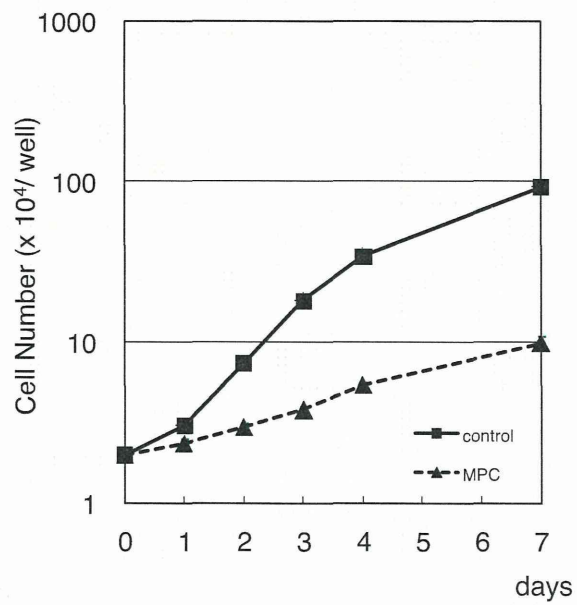


図7 MPCポリマーコートプレート上で培養したA549細胞の増殖曲線

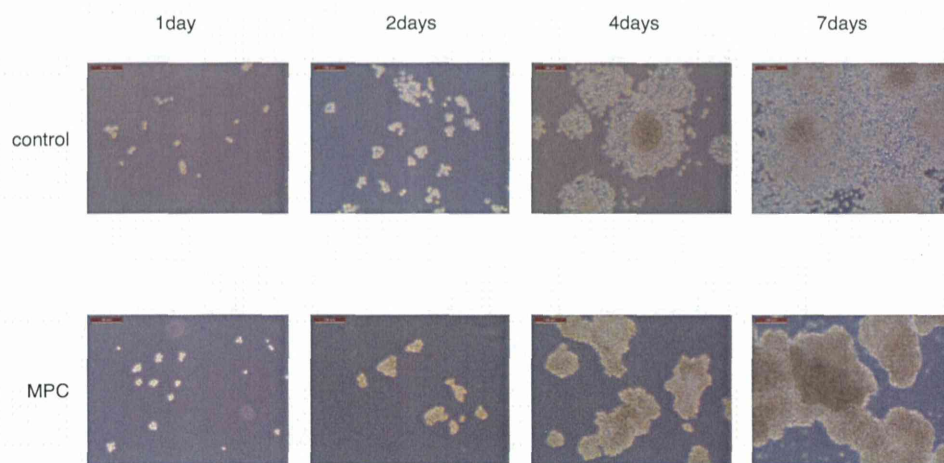


図8 MPCポリマーコートプレート上で培養したRAW264.7細胞

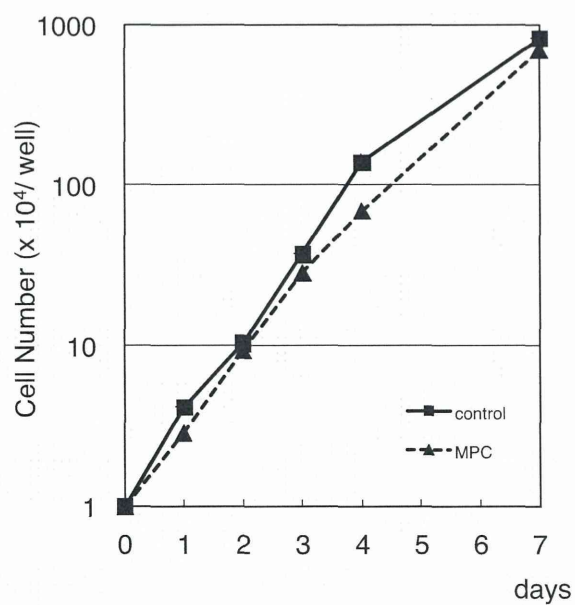


図9 MPCポリマーコートプレート上で培養したRAW264.7細胞の増殖曲線

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 <sub>4</sub> IC <sub>50</sub> (μM) (24h)		ZnO IC <sub>50</sub> (μg/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

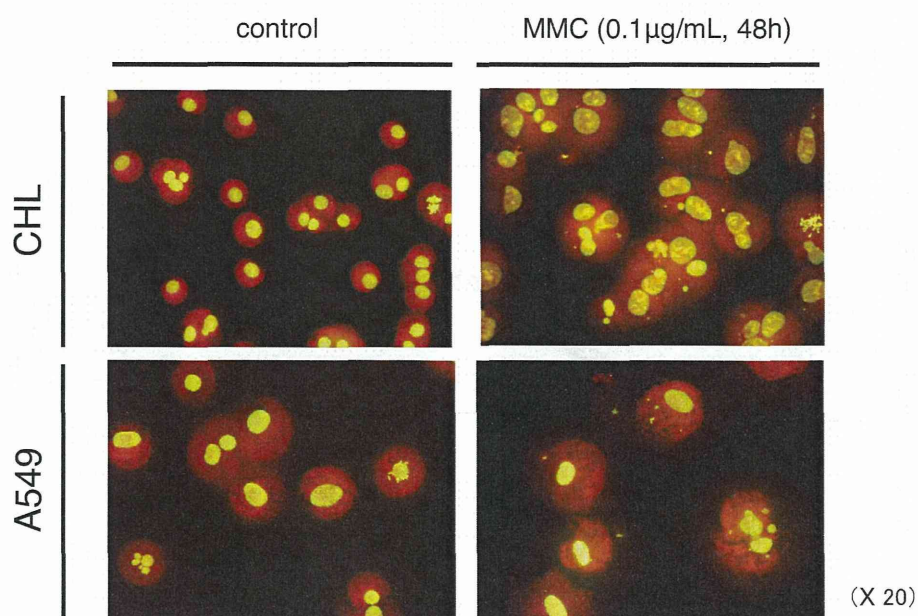


図10 CHL細胞及びA549細胞による小核試験

表3 MPCポリマーコートプレート上におけるCHL細胞及びA549細胞の小核試験の比較

Cell line			(µg/mL)	micronucleus (%)				MP	Multi-N	TF-N	
				MN-2	MN-3	Multi-MN	MN-total				
CHL	Control	48 h		0.4	0.5	0.0	0.9	2.8	0	0.1	
		48 h	MMC	0.02	1.9	0.5	0.3	2.7	1.3	0.1	0.3
		48 h	MMC	0.1	4.5	1.4	4.5	10.4	2.1	1.3	1.2
	MPC	48 h			0.4	0.8	0.2	1.4	1.9	0.1	0.4
		48 h	MMC	0.02	1.6	1.4	0.3	3.3	1.6	0.3	0.2
		48 h	MMC	0.1	5.0	1.0	4.1	10.1	1.6	0.9	1.6
A549	Control	48 h		0.9	0.5	1.2	2.6	1.6	0.4	1.2	
		48 h	MMC	0.02	1.8	1.3	1.0	4.1	0.5	0.4	1.3
		48 h	MMC	0.1	1.6	0.7	3.3	5.6	0.4	0.6	1.6
	MPC	48 h			0.7	1.2	1.4	3.3	1.2	0.5	0.5
		48 h	MMC	0.02	1.3	1.1	2.9	5.3	0.5	0.3	2.6
		48 h	MMC	0.1	1.8	1.8	4.9	8.5	0.3	1.5	6.0

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

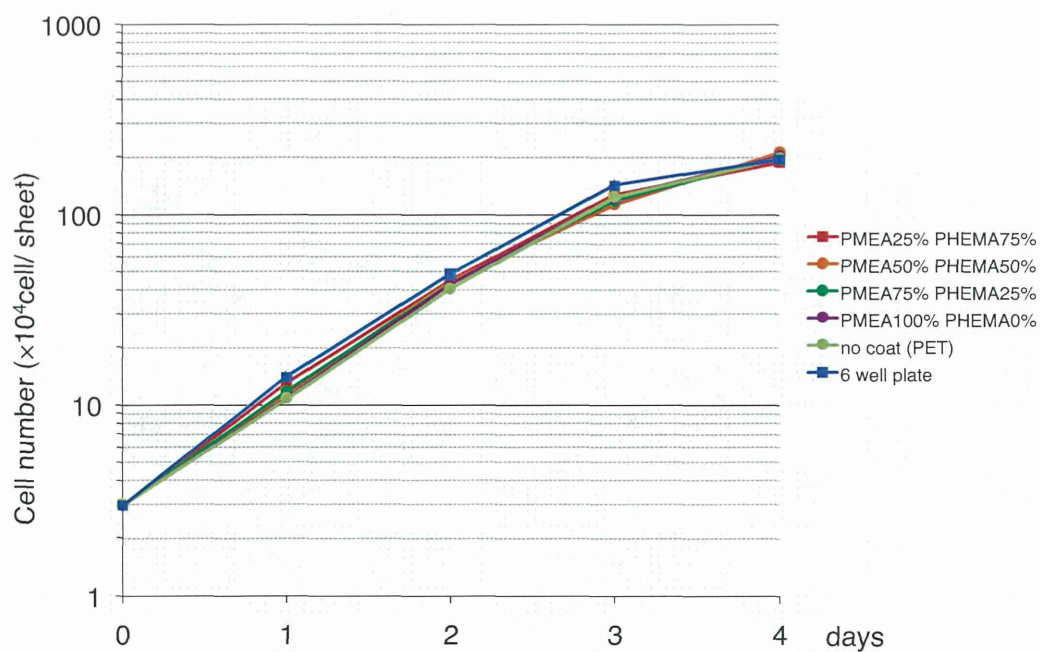


図11 HEMA/MEAコートPETシート上でのCHL細胞増殖曲線



## 【試験ガイドライン】

日本

- 「医療用具の製造(輸入)承認申請に必要な生物学的安全性試験の基本的考え方について」  
(平成15年2月13日 薬食機発0213001号 通知)  
「生物学的安全性試験の基本的考え方に関する参考資料について」  
(平成15年3月19日 医療機器審査No.36 事務連絡)  
引用規格: ISO 10993-4(1992), ISO/DIS 10993-4(2000), ASTM F756-93

- Biological Evaluation of Medical Devices - Part 4  
Selection of Test for Interactions with Blood  
ISO 10993-4, October 15, 2002  
AMENDMENT 1, July 15, 2006

2009年より改訂作業中

- 「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」  
(平成24年3月1日 薬食機発0301第20号 通知)  
引用規格: ISO 10993-4(2002) /Amd.1(2006), ASTM F756-08

図12 血液適合性試験に関する通知

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13 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。

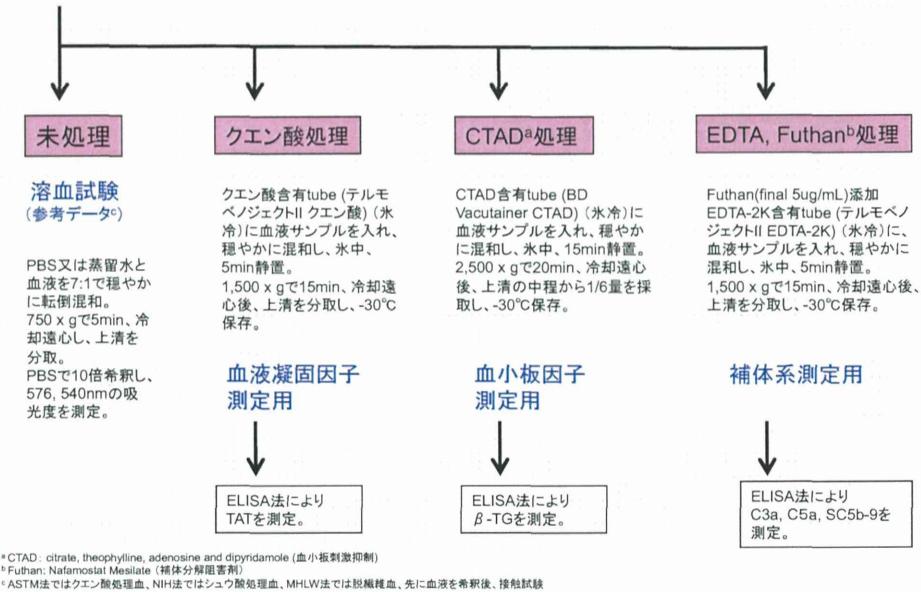


図14 血液適合性試験の実施方法の概略

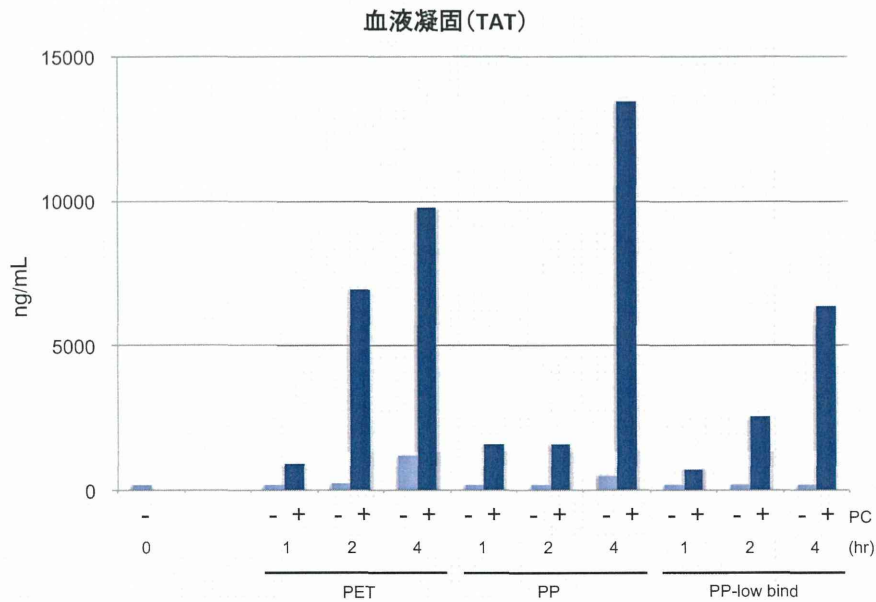


図15 血液適合性試験の試験条件の検討 血液凝固系(TAT)

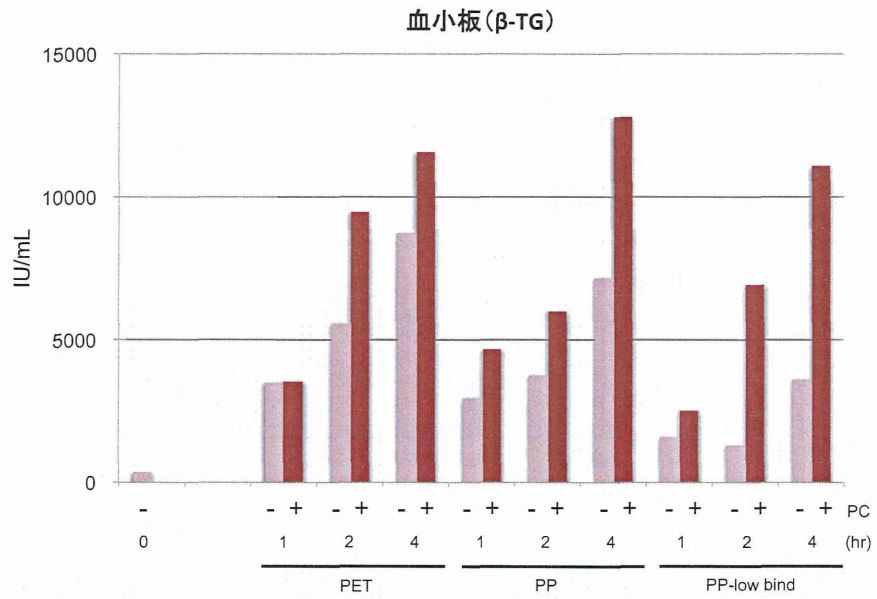


図16 血液適合性試験の試験条件の検討 血小板(β-TG)

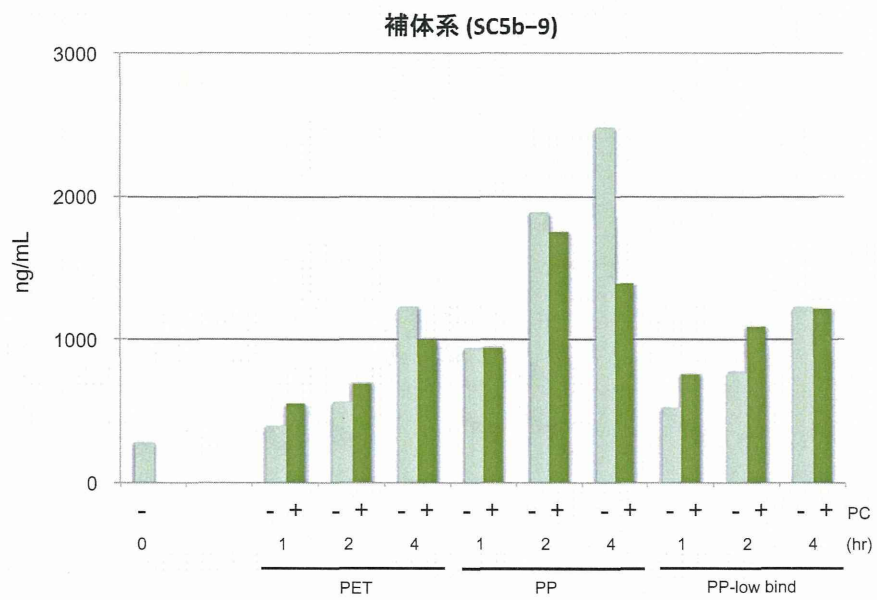


図17 血液適合性試験の試験条件の検討 補体系(SC5b-9)

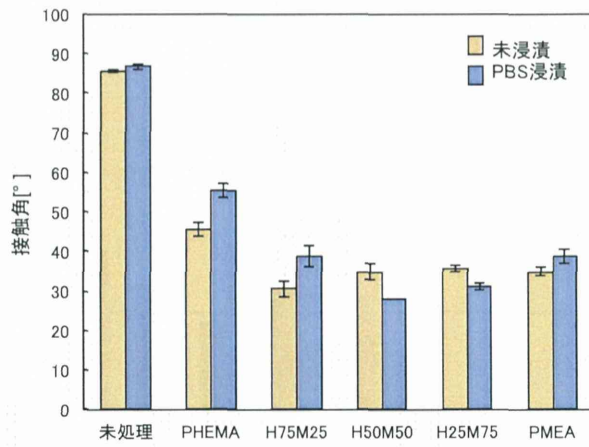


図18 混合比の異なるHEMA/MEAコポリマーコートPCシートの接触角

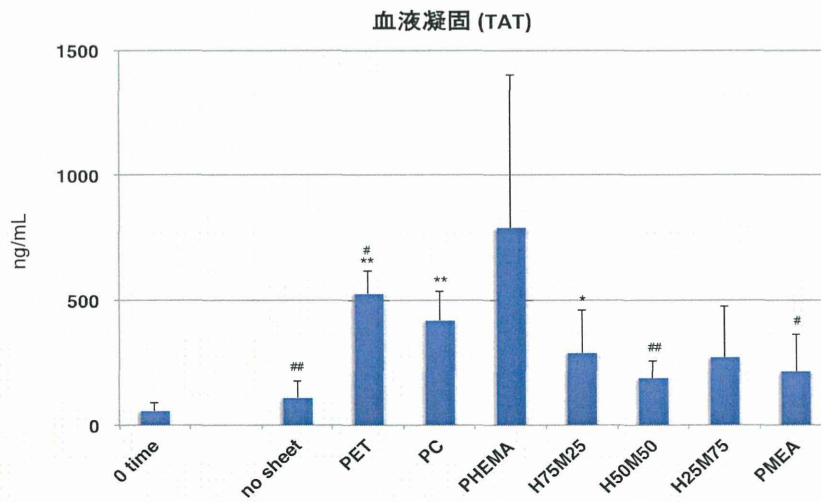


図19 混合比の異なるHEMA/MEAによる血液凝固系(TAT)の活性化

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, ##p < 0.01.

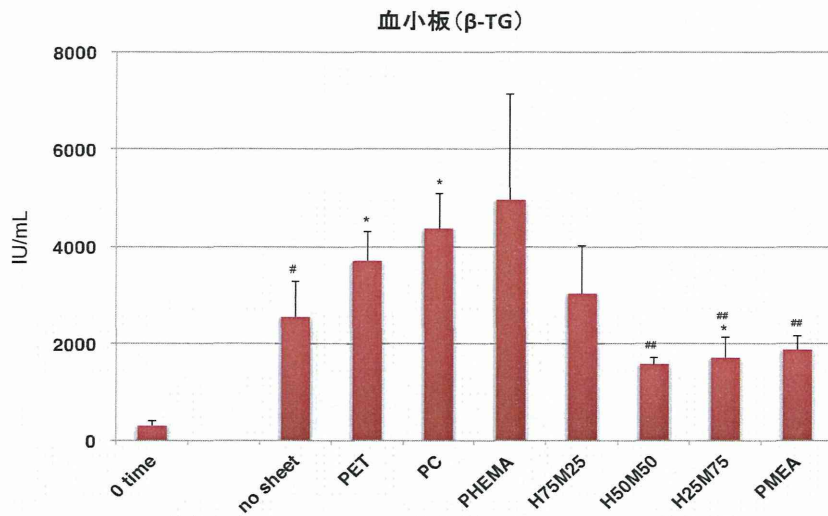


図20 混合比の異なるHEMA/MEAによる血小板(β-TG)の活性化

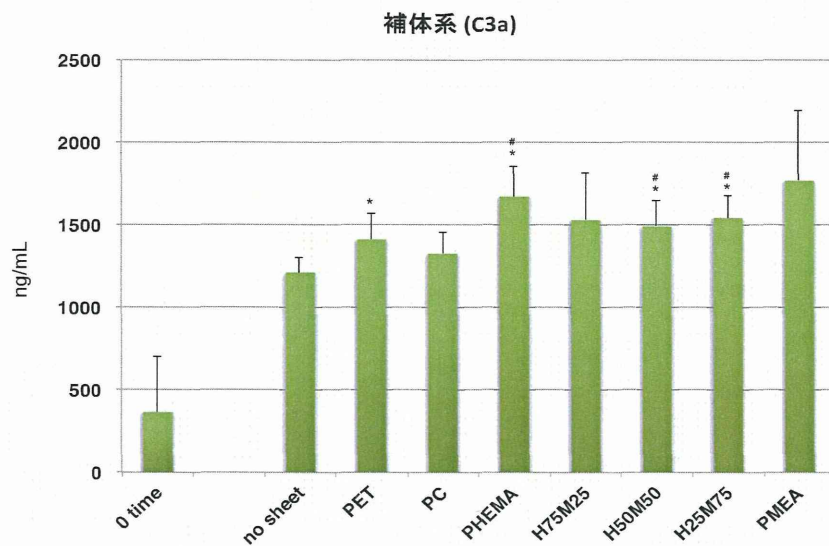


図21 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C3a)の活性化

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

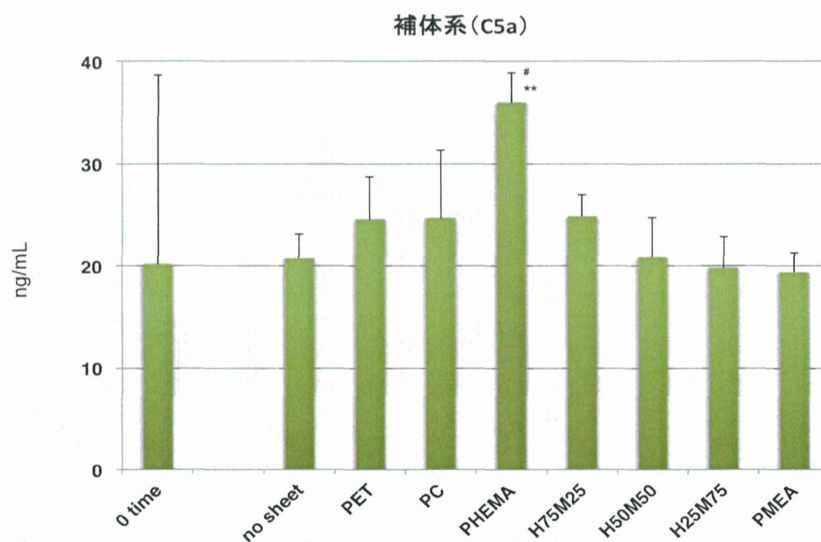


図22 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(C5a)の活性化

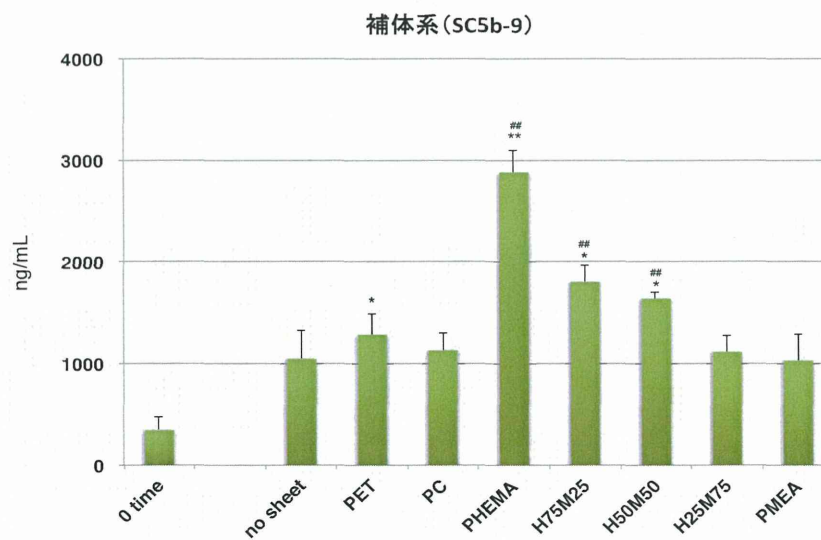


図23 混合比の異なるHEMA/MEAによる補体系(SC5b-9)の活性化

Values are expressed as mean  $\pm$  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.

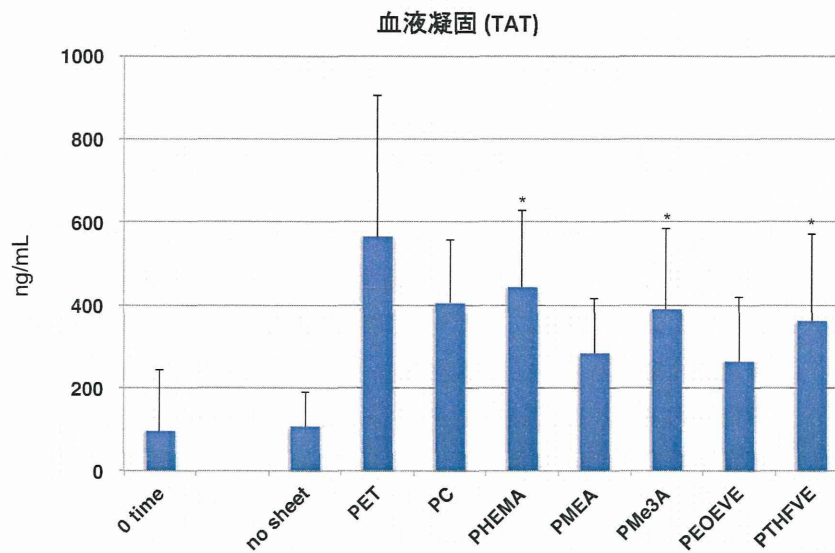


図24 新規材料による血液凝固系(TAT)の活性化評価

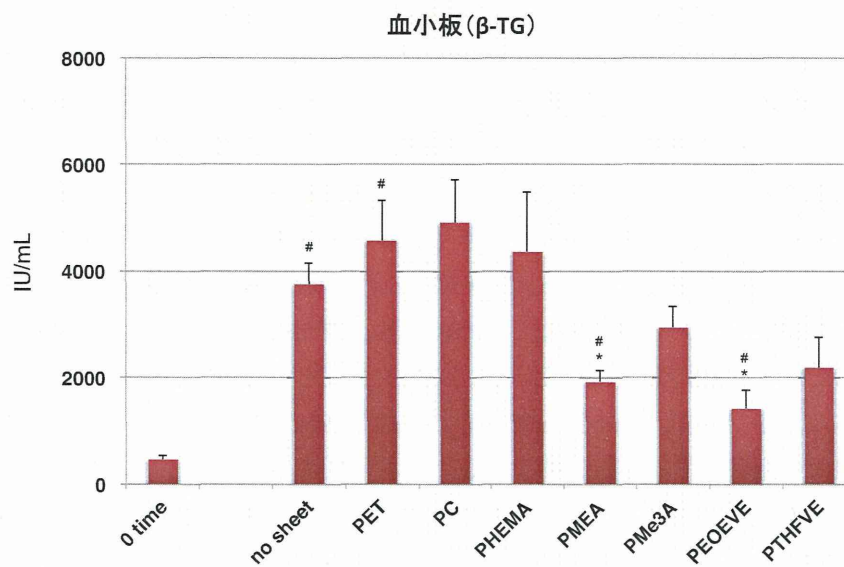


図25 新規材料による血小板( $\beta$ -TG)の活性化評価

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 配島由二 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、様々な生体適合高分子材料でコーティングした基材上で細胞を培養し、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。H24年度は組成比率の異なる MEA および HEMA のランダム共重合体でコーティングした表面がヒト間葉系幹細胞(hMSC)に与える影響を hMSC が産生するタンパク質網羅的発現比較解析で検討した。その結果、ランダム共重合体の組成比の違いが、コーティング表面上への吸着タンパク質の種類や量を変化させることを介して、hMSC の細胞形態や接着および細胞外マトリックスに関連するタンパク質群の発現に影響をおよぼすことが示唆された。H25年度は、検討細胞を血液球系細胞であるヒト単球細胞である THP-1 にし、PMEA および PHEMA によるコーティング表面が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかを、THP-1 が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて検討した。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を制御できることが示唆された。さらに、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、H26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、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基材上で培養した THP-1 間で比較検討を行った。その結果、培養 24 時間後では、CD86 はいずれの培養下でも対照とほとんど変化がみられなかった。CD54 の相対蛍光強度および培養上清中の IL-8 量の比較から、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 >> PMe3A 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。その一方で PMEA は PHEMA よりも吸着タンパク質が脱離しやすく、かつタンパク質の変性が少ないことも知られている。これまでに、これらの表面へ結合するタンパク質の総量や特定のタンパク質の結合状態の違いを検討した研究はあるが、細胞に与える影響を細胞側のタンパク質発現挙動の比較から検討した報告はない。そこで本研究では、タンパク質発現挙動に焦点をおき、生体適合性高分子材料の表面構造の血液適合性を評価できるマーカ探索を試みた。H24 年度は組成比率の異なる MEA および HEMA のランダム共重合体でコーティングした表面がヒト間葉系幹細胞(hMSC)に与える影響を hMSC が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて、H25 年度は検討細胞を血球系の THP-1 に変えて、PMEA および PHEMA によるコーテ

ィング表面が THP-1 細胞にどのような影響を与えるかを、THP-1 が産生するタンパク質網羅的発現比較解析にて、H26 年度は THP-1 の活性化表面マーカである 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 (hMSC 実験) : 厚さ 0.075 mm, 径 35 mm の三菱樹脂製 Pre-coated ポリエステル PET シート (ダイアホイル) (以下 PET と表記)

シート(THP-1 実験):厚さ 0.1 mm, 径 35 mm の菅原工芸製 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), 組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体 (混合比 100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%)

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

hMSC 実験 : 1 w/v%メタノール溶液の組成比の異なる MEA/HEMA ランダム共重合体を、メタノール溶液で洗浄した未処理 PET の中央に 125  $\mu$ l 滴下し、KYOWARIKEN 製 スピンコータ (K-359SD-1 SPINNER) で以

下の3ステップ(Step1: 500 rpm, 5 sec, Step2: 2,000 rpm, 10 sec, Step3: 4,000 rpm, 5 sec)にてコーティングした後、一晚乾燥させたシートを実験に用いた。以下、作製されたシートを PMEA と PHEMA の混合比 (100:0, 75:25, 50:50, 25:75 w/w%) 順にそれぞれを M100, M75H25, M50H50, M25H75 と表記する。

THP-1 実験: スピンコータの設置台上に 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

ヒト間葉系幹細胞 (hMSC; LONZA) を 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 Mesenchymal Stem Cell Basal Medium (MSCBM; LONZA) に Mesenchymal Stem Cell Growth Supplement (MSCGS; Lonza) を添加した培地 (MSCGM) 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  $1 \times 10^5$  細胞/3 ml を播種し、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下、37°C で二日間培養した。

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. 細胞タンパク質の回収

各コーティングシート上で培養した hMSC はシートごと、新しいシャーレに移し、冷 PBS で 6 回洗浄後、Cell Dissociation Buffer (Gibco) を用いて剥離した。その後、Cell Dissociation Buffer の 10 倍量以上の冷 PBS で 3 回洗浄した。一方、各コーティングシート上で培養した THP-1 は 15ml チューブに回収し、遠心した後、10 ml の冷 PBS で 1 回洗浄後、上清を捨て、1ml の冷 PBS に懸濁し 1.5ml に移し、遠心後、同じ操作を二回繰り返し、洗浄した。いずれの細胞も洗浄後、Complete Protease inhibitor Cocktail (Roche) を含む Protein Extraction Reagent type 4 (SIGMA) に溶解した。遠心分離により不溶物を除去し、2D clean-Up Kit (GE Healthcare) を用いてタンパク質を精製した後、Protein Extraction Reagent type 4 に再溶解し、2D-Quant (GE Healthcare) によりタンパク質量を測定した。得られたタンパク質試料は試験に供するまで -80°C にて凍結保存した。

### 6. MS 解析用ペプチド試料の調製

上記のようにして調製したタンパク質各 40  $\mu$ g (hMSC)、10  $\mu$ g (THP-1) を常法に従って、還元 (リン酸トリブチル)、アルキル化 (ヨードアセトアミド) した。この溶液に 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (hMSC: 86.2  $\mu$ l, THP-1: 77.2  $\mu$ l)、ProteaseMax Surfactant (1%, 5  $\mu$ l; Promega) 及び Trypsin Gold (1 mg/ml, 1.8  $\mu$ l;

Promega)を添加し、37°Cで一晩インキュベーションした後、10% トリフルオロ酢酸 (TFA) 5.25  $\mu$ l を加え、室温で5分間放置して反応を停止させた。得られたペプチドは OMIX Tip (C18, 100  $\mu$ l: VARIAN 社)を使用して脱塩し、Speed Vac (Savant)にて乾燥させた後、0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l の濃度になるように TFA 含有 2%アセトニトリルを加えて溶解し、LC-MS/MS 分析するまで4°Cで保存した。

#### 7. LC-MS/MS ショットガン解析

質量分析計は、リニアイオントラップ/フーリエ変換ハイブリッド型質量分析計 LTQ/Orbitrap XL(Thermo Scientific)を使用し、測定前に Tyrosine-1,3,6-Standard (CS Bio Co.)を用いてチューニング及び質量校正を行った。Nano-LC としては、HTC-PAL オートサンプラー (CTC Analytics) を装備した ADVANCE NanoUPLC (AMR) を使用した。トラップカートリッジ及び分析用逆相カラムとしては、それぞれ L-Trap (0.3 x 5 mm, L-C18, 5 mm, 12 nm; CERI)、L-column Micro L-C18 (0.1 x 150 mm, 3  $\mu$ m, 12 nm; CERI) を使用した。イオン源としては、バックグラウンド低減装置 (AMR 製 ABIRD) を装備した Captive Spray イオン源(AMR)を使用した。

試料のイオン化は ESI positive ion mode (スプレー電圧 1.6 kV)により行った。スキャンデータ (MS スペクトル)は FT analyzer (分解能 30,000; 測定質量範囲 m/z 300-1,400; Lock mass = シロキサラン及びフタル酸ジエチルヘキシル; Profile mode)により取得し、XCalibur data dependent mode により、各スキャンにおけるイオン強度の高い3種のピークを順次選択してイオントラップにより MS/MS スペクトルを測定した (CID, Normalized collision energy 35 kV, Activation

time 300 ms, Dynamic exclusion duration 60 s, Centroid mode)。測定時間は 150 分間とし、価数判別機能を利用して 1 価イオンの MS/MS スペクトルは測定しないように設定した。

Nano-LC の移動相には、A 溶媒 (0.1%ギ酸)と B 溶媒 (アセトニトリル)を使用した。流速は 300 nl/min とし、サンプル注入 (1.0  $\mu$ l)はオートサンプラーを使用した。一分分析当たりの溶出時間は 150 分とし、サンプル注入後、0-40%B/125 min  $\rightarrow$  40-55%B/130 min  $\rightarrow$  100%B/135 min  $\rightarrow$  100%B/140 min  $\rightarrow$  0%B/ 150 min のグラジエント条件により溶出した。また、次の分析に移行する前に流路を 2 回洗浄した。測定の繰り返し数は n=2 とした。

分析終了後、得られた MS データに基づいて作成した Reject Mass List (8 参照)を Method File に登録し、同様の分析を更に 2 回繰り返すことにより、MS/MS データを取得するペプチド数を増加させた。

#### 8. タンパク質の同定と定量

##### 8-1. Reject Mass List の作成

LC-MS/MS 解析において得られた MS データをタンパク質解析用プラットフォーム Proteome Discoverer ソフトウェア v1.3 (PD1.3) (Thermo Scientific) に転送し、Mascot 検索 Work Flow/UniPort/Swiss-Prot データベースを利用してタンパク質同定を行った後、同定された全てのペプチドサーチ結果を Reject Mass List に指定した。リテンションタイムトレランスは hMSC サンプルの場合:  $\pm$  1 分、THP-1 サンプルの場合は  $\pm$  5 分に設定した。

##### 8-2. 比較定量解析

hMSC サンプル：タンパク質の多変量解析は i-RUBY ソフトウェア（メディカルプロテオスコープ）を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群（各試料 n = 2 x 2）を同ソフトウェアにインストールした後、Mascot/UniPort/Swiss-Prot データベースによるタンパク質同定、MS/MS スペクトル相同性に基づいたピークマッチングを行うことにより、タンパク質の比較定量解析を行った。

THP-1 サンプル：タンパク質の多変量解析は SIEVE2.0 ソフトウェア（Thermo Scientific）を用いて行った。LC-MS/MS 解析において得られた全ての MS データ群を同ソフトウェアにインストールし、標的イオンの m/z とリテンションタイムの相同性に基づいたピークマッチングを行い、PD1.3 により同定したタンパク質情報をインストールして、多変量解析をおこなった。

8-3. オントロジー解析とパスウェイ解析  
タンパク質への機能情報付加とパスウェイ解析は Ingenuity Pathway Analysis (IPA)を用いて行った。

#### 9. THP-1 の活性化マーカー測定 (Human Cell Line Activation Test(h-CLAT 法)の一部改変)

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 のブロッキングを行った。ブロッキング後、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

h-CLAT 法における、試験対象物の陽性・陰性判定は下記の通りである。

陽性基準値 (CD54 RFI = 200, CD86 RFI = 150)

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する。

#### 10. 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。