

Polytetrafluoroethylene 樹脂表面上での
細胞観察手法の開発および
血中分子の及ぼす影響

A development of a live-cell observation method
and analyses of the effect of blood molecules on the cell adhesion
on the surface of Polytetrafluoroethylene

2016年 9月

麻布大学大学院 獣医学研究科

動物応用科学専攻

動物工学

DA1361 犬飼 直人

目次

要約

略称リスト

1. 緒論	1
2. Polytetrafluoroethylene (PTFE) コートガラスを用いた PTFE 表面の観察	5
2.1. 序論	
2.2. 材料と方法	
2.2.1. 基材	
2.2.2. 光透過率評価	
2.2.3. 細胞培養	
2.2.4. 細胞増殖抑制評価	
2.2.5. 基材への血漿処理	
2.2.6. 基材への細胞接着評価	
2.2.7. 蛍光染色	
2.2.8. 統計学的処理	
2.3. 結果および考察	
2.3.1. PTFE コートガラスの構造および外観	
2.3.2. 吸光スペクトルおよび光透過率評価	
2.3.3. 細胞増殖抑制評価	
2.3.4. 細胞接着評価	
2.3.5. 細胞接着に血漿が与える影響	
2.3.6. 位相差顕微鏡観察	
2.4. 結論	
3. PTFE 表面への細胞接着機構の解析および接着促進物質の探索	17
3.1. 序論	
3.2. 材料と方法	
3.2.1. 基材	
3.2.2. 細胞培養	
3.2.3. 基材への血漿、血清処理	
3.2.4. 血漿を介した接着機構の解析	

3.2.5.	基材へのタンパク質コーティング処理	
3.2.6.	PTFE コートガラスへの細胞接着評価	
3.2.7.	血小板接着評価	
3.2.8.	経日的観察	
3.2.9.	統計学的処理	
3.3.	結果および考察	
3.3.1.	血漿を介した接着機構の解析	
3.3.2.	血中および血管壁の接着分子の関与	
3.3.3.	血漿と血清の細胞接着への影響	
3.3.4.	PTFE 表面に接着した細胞の経日観察	
3.4.	結論	
4.	総括	31
5.	謝辞	33
6.	引用文献	34
	図表	39

Abstract

Polytetrafluoroethylene (PTFE), a kind of fluoropolymer, is widely used as a biomaterial for blood-contacting medical devices because of its properties, such as good biocompatibility, chemical stability and anti-cellular adhesiveness. In blood vessel prostheses, the anti-platelets adhesiveness and endothelialization on the surface of PTFE have been studied for the suppression of thrombus formation. Especially, the endothelialization plays an important role for the longstanding suppression of thrombus formation, the stability of the endothelial adhesiveness on the PTFE is important for that. Inverted phase-contrast microscopy is suitable for the chronological observation, which is needed to estimate the stability of the cellular adhesiveness on the PTFE. However, it is difficult to observe on the surface of thick PTFE, which have sufficient mechanical strength for use in biological experiments, by inverted phase-contrast microscopy because of its low optical transmittance. Although a thin layer of PTFE is likely to have low optical transmittance sufficient for observation under an inverted phase-contrast microscope such a thin layer would have insufficient mechanical strength. In the present study, we developed a PTFE-coated glass with optical transmittance sufficient for observation under an inverted phase-contrast microscope but with sufficient mechanical strength for use in biological experiments. The purpose of this thesis is that the observation of cells under an inverted phase-contrast microscope and the analysis of the effect of blood molecules on the cell adhesion on the surface of PTFE by using the PTFE-coated glass. The background of this thesis was explained in the first chapter. The PTFE-coated glass, which was made by the PTFE coating on the cover glass, was developed to achieve these opposite properties, the optical transmittance and

mechanical strength, in the second chapter. Rat aortic endothelial cells (RAOECs) were seeded on the PTFE-coated glass treated with plasma that achieves the cell adhesion to PTFE. The observation of RAOECs on the PTFE-coated glass was tried by using an inverted phase-contrast microscope and an inverted fluorescence microscope. It was possible to observe RAOECs on the surface of the PTFE-coated glass by using these microscopes. Any recognizable damage or peeling was recognized in the present study. These results showed that the PTFE-coated glass has sufficient strength and transmittance to be used for biological experiments. The PTFE-coated glass enabled live-cell observation of the PTFE surface using a phase-contrast microscope and also chronological observation. We estimated the effects of the blood molecules and extra cellular matrix on the RAOECs adhesion to PTFE, in third chapter. RAOECs or platelets were seeded on the PTFE-coated glass, which was treated with plasma, serum or cell adhesion molecules contained in blood and extra cellular matrix. The estimation of morphology and adhesion of RAOECs and platelets on the PTFE surface showed that treatment with the fibronectin, laminin, collagen, plasma and serum enhanced the cell adhesion, and tended to suppress the platelets adhesion. The chronological observation of RAOECs on the PTFE-coated glass treated with the fibronectin, laminin, collagen or plasma was performed by using phase-contrast microscopy. RAOECs stably adhered, proliferated, and covered the PTFE surface within 3 days by treatment with fibronectin and laminin. The plasma and collagen also enhanced the cell adhesion to the PTFE surface, however most RAOECs were detached within 7 days. These results suggested that RAOECs unsteadily adhere to the PTFE synthetic graft implanted via blood molecules, the speed of endothelialization of the graft is delayed by the detachment of the endothelial cells from that. It was suggested that the treatment with the fibronectin

and laminin suppress the thrombus of the PTFE synthetic graft implanted by both the rapid endothelialization caused by the stably adhesion of endothelial cells and the suppression of the platelets adhesion.

要約

Polytetrafluoroethylene (PTFE) とはフッ素樹脂の一種であり、生体適合性、化学的安定性、抗細胞接着性の高さから、血液接触型の医療機器に広く使用されている。人工血管においても PTFE は使用されており、血栓形成の抑制のために、血小板付着性や血管内皮細胞による血管内壁の裏打ち（内皮化）の研究が行われている。PTFE 製人工血管への長期にわたる抗血栓性付与には、内皮化が必要であり、血管内皮細胞の接着の安定性が重要となる。細胞接着の安定性の評価には、経日的な観察が必要であり、その解析には位相差顕微鏡による観察が最も適していると考えられる。しかしながら、PTFE は光透過率と機械的強度がともに低いため、実験に十分な強度の厚さでは位相差顕微鏡での観察には光透過率が不十分である。一方、薄膜であれば位相差観察は可能であると予測されるが、機械的強度が十分ではない。そこで、本論文では光透過率と物理的強度を両立させるために、ガラス表面に PTFE コーティングを施した PTFE コートガラス (PTFE-coated glass) を作製した。PTFE コートガラスを用いた PTFE 表面上の細胞の位相差顕微鏡観察および、PTFE 表面への血中分子を介した細胞接着の解析を本研究の目的とした。

第 1 章ではこれらの本研究で扱う背景を論じた。第 2 章では、相反する性質である光透過率と機械的強度を両立させるために、カバーガラス上に 10 μm 以下の膜厚の PTFE コーティングを施した PTFE コートガラスを開発した。PTFE コートガラス表面に血漿処理を施すことで、PTFE 表面への細胞接着を誘導し、ラット大動脈血管内皮細胞 (RAOEC) を播種した。位相差顕微鏡および倒立蛍光顕微鏡を用いて、PTFE コートガラス表面に接着した細胞を観察した。この結果、PTFE コートガラスを用いることで、位相差顕微鏡と倒立蛍光顕微鏡の

いずれにおいても PTFE 表面に接着した細胞の観察が可能であった。また、実験中に大きな傷や剥離が確認されなかった。これらのことから、位相差顕微鏡観察に十分な光透過率と機械的強度を持つことが示された。PTFE コートガラスを用いることで、PTFE に接着した細胞を簡便に位相差顕微鏡観察することが可能であるため、PTFE 表面に接着した細胞の経日的な安定性についても容易に解析することが可能となった。第 3 章では、PTFE 表面への細胞接着において、血中の接着分子や血管の細胞外マトリクスが及ぼす影響を評価した。PTFE コートガラス表面に血中や細胞外マトリクスに含まれる接着分子、血漿および血清による処理を施し、RAOEC もしくはラット血小板を播種した。PTFE 表面の細胞の形態や接着細胞数を解析した結果、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン、血漿および血清が PTFE 表面への細胞接着を誘導することを示し、また血小板の接着を抑制する傾向を示した。続いて、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンもしくは血漿処理を施した PTFE コートガラスに RAOEC を播種し、経日的に位相差顕微鏡で観察した。フィブロネクチンとラミニンを介した PTFE 表面への接着は安定であり細胞増殖も可能になり、播種 3～6 日で PTFE 表面の内皮化が完了した。血漿およびコラーゲンも PTFE 表面への細胞接着を誘導したが、その接着は不安定であり、播種 6 日後にはほとんどの内皮細胞が剥離した。このことから、移植された PTFE 製人工血管において、その表面に血中の接着分子を介して細胞が接着するが、その接着は不安定であり、接着と剥離を繰り返し、遅い内皮化が起こることが示唆された。一方、フィブロネクチンやラミニンは、血管内皮細胞の安定した接着による早期の内皮化を可能にし、また血小板の接着を抑制するという両面から、PTFE 製人工血管の血栓形成を抑制することが示唆された。

略称リスト

PTFE : PolyTetraFluoroEthylene、フッ素樹脂の一種で最も単純な構造

ePTFE : expanded PTFE、延伸多孔質 PTFE、PTFE と化学的組成は全く同一だが延伸処理により微細な（数十 μm 程度）の孔が存在する。

RAOEC : Rat Aortic Endothelial Cells、ラット大動脈内皮細胞

PBS(-) : Phosphate Buffered Saline (-)、カルシウムとマグネシウムを含まないリン酸緩衝食塩水

CSFE : 5- or 6-(N-succinimidylloxycarbonyl) fluorescein 3',6'-diacetate

PI : propidium iodide

FBS : Fetal Bovine Serum、ウシ胎児血清

RGDS : アルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン、インテグリン介在性の接着を阻害するペプチド

1. 緒論

フッ素樹脂は炭素骨格にフッ素原子が結合したポリマーである。フッ素は電気陰性度が 3.98 と全元素中で最も高いため、炭素骨格と非常に強固で安定して結合する。このため、フッ素樹脂は化学的安定性が極めて高く、アルカリや酸などの薬品に侵されることがほとんど無い。また、フッ素の電気陰性度が高いため、フッ素樹脂の分子間力は極めて低く、それに伴い表面張力も低くなる。これらの結果、フッ素樹脂は、高い化学的安定性、撥水性、非粘着性、滑り性、耐熱性、絶縁性といった特徴を持つ。フッ素樹脂はこれらの特徴から、工業用、医療用問わず様々な分野で使用されている。塗料としても、様々な製品に耐薬品性、絶縁性、滑り性を付与するために用いられている。フッ素樹脂塗装は一般的にデュポン社のテフロン®という商標で広く知られており、フライパンなどへのタンパク質、油や焦げ付きの付着を抑制させることが可能である。

フッ素樹脂にはいくつかの種類があり、炭素とフッ素のみからなる Polytetrafluoroethylene (PTFE) をはじめとして、そのフッ素原子の一部を水素原子に置換した Polyvinylidene difluoride (PVDF)、パーフルオロアルキル基に置換した Perfluoro alkoxy alkane (PFA) など様々な種類がある (Table 1)。また、フッ素樹脂のみでは機械的強度が低いことから、塗料など用途によってはエポキシ樹脂などの、機械的強度が高い樹脂と混ぜ合わせたものが使われている。このようにフッ素樹脂と一般的に呼ばれる製品には数多くの組み合わせ、配合が存在するが、その詳細は各々の企業のノウハウであるため公表されることは少ない。

フッ素樹脂の医療用途として、その化学的安定性から生体への安全性が高いことに加え、高い滑り性、非粘着性から血栓形成抑制が期待できるため、血液

接触型医療機器である人工血管やカテーテルなどが挙げられる (Naoum and Arbid 2012, Roy-Chaudhury *et al.* 2002, Stephen 1993)。人工血管にはフッ素樹脂うち PTFE が使用されており、比較的小口径のものに用いられている。しかし、PTFE 製人工血管においても血栓形成や内膜肥厚といった血管閉塞の問題は避けられない。下肢バイパス手術などでは小口径の PTFE 製人工血管が必要とされるものの、血栓形成が問題となっている (Narita *et al.* 2008, Peck *et al.* 2012)。このため、直径 6 mm 未満の PTFE 製人工血管を移植することは、一般的に行われにくい (Peck *et al.* 2012, Stegemann *et al.* 2007)。小口径の人工血管を実現するために、血栓形成や内膜肥厚の抑制に関する研究が進められており、接着分子、抗体、ヘパリン、オリゴヌクレオチドなどの分子で内壁をコーティングする手法が報告されている (Hoshi *et al.* 2013, Mrowczynski *et al.* 2014, Schleicher *et al.* 2012, Wijelath *et al.* 2010, Williams *et al.* 2011)。これらは PTFE 製人工血管への血小板の接着を直接抑制する、あるいは、内皮細胞による血管内壁の裏打ち (内皮化) の促進による間接的な血小板接着抑制による血栓形成抑制を目的としている。特に、内皮化は血栓形成と内膜肥厚のどちらにも有効である。内皮化は血小板の付着を抑制するため、血栓形成を抑制すると考えられている (Koveker *et al.* 1988, Tremoli *et al.* 1985)。また、PTFE 製人工血管における内膜肥厚は吻合部に発生しやすく、これは PTFE 製人工血管に対する内皮細胞の接着が不安定であるために生じると考えられている (赤羽 *et al.* 1985)。このため、PTFE 表面への安定した血管内皮細胞の接着や遊走を促すことが、血管閉塞に有効だと考えられる。

PTFE 製人工血管の素材には、PTFE を引き延ばすことで微細な孔を開け、機械的強度やガス透過性などを血管に類似させた延伸多孔質 PTFE (expanded PTFE, ePTFE) が使用されている。このため、PTFE 製人工血管における研究

は ePTFE 製チューブを用いて広く行われている (Koveker *et al.* 1988, Koveker *et al.* 1991, Wijelath *et al.* 2010, Williams *et al.* 2011)。しかし、人工血管の内皮化は、その微細構造、縫合性状や血流の影響などが関与するため、その過程は複雑である (Boyd *et al.* 1988, 赤羽 *et al.* 1985, 西岡 *et al.* 1991)。このため、PTFE 製人工血管を用いた場合、内皮細胞のフッ素樹脂表面への接着機構などの基礎的な解明が難しい。基礎的な解明には、まず培養細胞を用いて、ePTFE ではなく PTFE 表面に対する接着機構を解明する必要があると考えられる。しかし、血管内皮細胞と PTFE 表面との相互作用の研究、さらに血液との接触を想定した基礎研究は現在までのところ 2 報と少なく、接着の安定性などの内皮化に重要な解析は行われていない (Kaibara and Kawamoto 2002, Grainger *et al.* 2003)。

培養細胞を用いた研究が少ない原因の一つとして、PTFE の光透過率の低さが考えられる。一般的に培養細胞の観察には、透過光を用いた位相差顕微鏡による観察が広く行われる。位相差観察の特徴として、細胞を非侵襲的に容易に連続観察できるということがあげられる。細胞の形態観察は、細胞の接着、遊走、増殖等を簡便に評価するために重要な手法である。このため、細胞培養の容器にはガラスやポリスチレンといった透明性の高い物質が用いられている。しかし PTFE では、位相差観察するには十分な透過光が得られないことから、電子顕微鏡による観察が行われているため連続観察を行うことができない。また、共焦点顕微鏡を用いれば生細胞の観察も可能であると予測されるが、蛍光物質による染色が必要であり、消光の問題から連続観察に用いることは困難である。PTFE を 10 μm 程度とフィルム状に薄くすることで十分な光透過率は得られると考えられるが、物理的強度が低くなってしまい、実験を安定して行うことが困難であると予測される。先行研究においては、PTFE は 0.6~1 mm の

厚さで用いられており、連続観察などの解析は行われていない (Pu *et al.* 1991, Grainger *et al.* 2003, Sprague *et al.* 2005)。

そこで、本論文では光透過率と物理的強度を両立させるために、ガラス表面に PTFE コーティングを施した PTFE コートガラス (PTFE-coated glass) を開発した。PTFE コートガラスを用いて PTFE 表面上の細胞の位相差顕微鏡観察および、PTFE 表面への血中分子を介した細胞接着を解析した。

2. Polytetrafluoroethylene (PTFE) コートガラスを用いた PTFE 表面の観察

2.1. 序論

PTFE は血液接触型の医療機器に使用されるため、PTFE 表面に対する血栓形成の原因となる血小板付着性や、血管内皮細胞の接着性が研究されている。しかし、培養細胞を用いた血液を介した PTFE への接着における基礎的な報告は少なく、調べた限りでは 1 報のみである (Grainger *et al.* 2003)。この原因の一つとして、PTFE の光透過率の低さが挙げられる。

PTFE を 10 μm 程度とフィルム状に薄くすることで十分な光透過率は得られると考えられるが、物理的強度が低くなり、実験を安定して行うことが困難であると予測され、報告は見当たらない。そこで、本章では光透過率と物理的強度を両立させるために、ガラス表面に PTFE コーティングを施した PTFE コートガラス (PTFE-coated glass) を作製した。これは一般的に培養細胞に用いられるカバーガラスに 10 μm 以下の膜厚の PTFE 塗装を施したもので、日本ケミカルコート株式会社 (相模原) に依頼し作製した。類似品は、フナコシ株式会社 (東京) などからテフロン®プリントガラスなどの商品名で市販されている。これはスライドガラス上にフッ素樹脂コーティングで間仕切りを作ることで、1 枚のスライドガラスで複数種類の免疫染色を可能にする商品である。これらのコーティングには顔料が使用されているため、透過光での観察は不可能である。さらに、テフロン®はフッ素樹脂の種類を限定しないため、PTFE が用いられているかは不明である。また、一般的に PTFE コーティングに用いられる塗料には、エポキシ樹脂など高強度の樹脂が含有されている。これは、塗膜の耐久性向上など高機能化のために用いられており、その配合は塗装会社のノウハウであるため、どのような樹脂がどの程度の比率で含まれているかは一般的に開示

されない。これらのことから、PTFE と細胞の接着メカニズムの解析に、市販のフッ素樹脂コートガラスは適していない。一方、本研究で作製した PTFE コートガラスの塗料には、顔料や PTFE 以外の樹脂が入っていないため、PTFE と細胞の接着メカニズムの解析を行うことができる。

本章では、PTFE コートガラスを用いることで PTFE 表面の生細胞を、位相差顕微鏡により観察可能か検討した。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 基材

PTFE コートガラスは 24 mm×24 mm のカバーガラス (C024241, 松浪ガラス, 岸和田) に、PTFE を 10 μ m 以下の膜厚でコーティングした。コーティングは日本ケミカルコート株式会社 (相模原) に、PTFE 以外の樹脂や顔料を含まない塗膜で依頼した。PTFE ブロックは膜厚 1 mm の PTFE-sheet (1-537-01, アズワン株式会社, 大阪) を 24 mm×24 mm の大きさに切断して作製した。いずれも 180 °C 90 分間の乾熱滅菌後に使用した。

2.2.2. 光透過率評価

PTFE コートガラス、PTFE ブロックは、吸光度計 Sunrise™ RAINBOW (テカンジャパン, 川崎) を用いて 400 nm から 700 nm の吸光度を 5 nm 間隔で測定した。光透過率は吸光度から以下の計算式より算出した

$$\text{光透過率} = 100 / (10^A)$$

$$A = \text{吸光度}$$

2.2.3. 細胞培養

供試細胞はラット大動脈内皮細胞 (Rat Aortic Endothelial Cells, RAOEC, 東洋紡, 大阪) を使用し、培地は CS-C 培地キット (4Z3-500-R, DS ファーマ, 吹田) を用いた。維持培地には CS-C 培地キットにペニシリンを 100 U/ mL、ストレプトマイシンを 100 μ g/ mL、10%ウシ胎児血清 (FBS, S1500, フナコシ株式会社, 東京) を添加した。ディッシュとして 10 cm コラーゲン type-I コートディッシュ (4020-010, AGC 旭硝子, 東京) を用いた。細胞の観察には位相

差顕微鏡（IX70，オリンパス株式会社，東京）を使用した。

細胞培養のプロトコールは以下の通りである。

- 1) サブコンフルエント（ディッシュの底面の 80～90%を細胞が覆った状態）に達した RAOEC を PBS (-) 5 mL で洗浄
- 2) 0.05%トリプシン 0.02% EDTA/PBS(-) 0.5 mL を添加し 37°Cに加温
- 3) 細胞が剥がれたら維持培地 8.5 mL で懸濁し、その 1/3～1/4 を、培地総量が 9mL になるように用意した新しい維持培地に添加
- 4) 細胞が均一になるようにディッシュを静かに揺らし、37°C 5%CO₂ に設定したインキュベーターに静置

2.2.4. PTFE の細胞増殖抑制評価

PTFE ブロック、PTFE コートガラス表面の PTFE を粉碎し、維持培地に 10% (w/v) で浸漬させ、37°C 5%CO₂ 条件で 24 時間インキュベートして PTFE 浸漬培地を得た。PTFE 浸漬培地を 0.22 μm フィルター（025022S-SFNY，アズワン株式会社，大阪）でろ過し、RAOEC に対する細胞増殖抑制を Cell Counting Kit-8（株式会社 同仁化学研究所，熊本）を用いて評価した。

プロトコールは以下の通りである

- 1) サブコンフルエントに達した RAOEC を PBS (-) 5 mL で洗浄
- 2) 0.05%トリプシン 0.02% EDTA/PBS(-) 0.5 mL を添加し 37°Cに加温
- 3) 細胞が剥がれたら維持培地 8.5 mL で懸濁し、100 g で 5 分間遠心
- 4) 培地を除き、1 mL の維持培地で懸濁
- 5) 懸濁液 10 μL を維持培地 90 μL で希釈し、0.5%トリパンプルー溶液と 1 : 1 の割合で混和し、血球計算盤を用いて細胞濃度を計算
- 6) 4) の懸濁液を 2.0×10⁵ cells/ mL に希釈し、100 μL/ well の量で 96 well

- プレート (TR5003, 日本ジェネティクス, 東京) に播種
- 7) 37°C 5%CO₂ に設定したインキュベーターに 24 時間静置
 - 8) 培地を除き、PTFE 浸漬培地を 100 μL 加え 37°C 5%CO₂ に設定したインキュベーターに 24 時間静置
 - 9) 培地を除き 1 well あたり維持培地 90 μL と Cell Counting Kit-8 10 μL を添加し、37°C 5%CO₂ で 30 分間インキュベート
 - 10) 450 nm の吸光度を Sunrise™ RAINBOW を用いて測定
 - 11) 吸光度を PTFE 無添加培地に対する割合で評価

2.2.5. 基材への血漿処理

本研究における全ての動物実験は麻布大学動物実験委員会のガイドラインに従って実施した (承認番号 130315-5, 160323)。

8~10 週齢の雄ラットにソムノペンチル (共立製薬株式会社, 東京) をペントバルビタールナトリウムとして 75 mg/kg i.p. で投与し深麻酔をかけた。深麻酔下において腹部後大静脈から全採血し、採血直後の全血と 3.8%クエン酸ナトリウムを 9 : 1 の比率で混合し、4°C 1,600 g で 30 分遠心し、血漿を得た。全採血後にラットは深麻酔下における放血により安楽死させた。得られた血漿は、ポアサイズ 0.22 μm のシリンジフィルター (025022S-SFNY, アズワン株式会社, 大阪) でろ過した後に使用した。血漿を入れた 35 mm ポリスチレンディッシュ (TR4000, 日本ジェネティクス, 東京) に、PTFE コートガラスおよび PTFE ブロックを浸漬させ、37°C で一昼夜静置することで PTFE 表面への血漿処理を行った。血漿処理後は PBS (-) で一回洗浄し、細胞接着評価に用いた。

2.2.6. 基材への細胞接着評価

35mm ポリスチレンディッシュ (TR4000) に、無処理のガラス (C024241)、PTFE コートガラス、PTFE ブロック (1-537-01)、血清処理 PTFE コートガラス、血清処理 PTFE ブロックをそれぞれ置き、RAOEC を播種した。細胞接着に対する血清の影響を避けるために、無血清培地を使用した。24 時間後に接着細胞数を Cell Counting Kit-8 を用いて算出した。

プロトコールは以下の通りである。

- 1) サブコンフルエントに達した RAOEC を PBS (-) 5 mL で洗浄
- 2) 0.05%トリプシン 0.02% EDTA/PBS(-) 0.5 mL を添加し 37°C に加温
- 3) 細胞が剥がれたら維持培地 8.5 mL で懸濁し、100 g で 5 分間遠心
- 4) 維持培地を除き、無血清培地で懸濁
- 5) 懸濁液 10 μ L を無血清培地 90 μ L で希釈し、0.5%トリパンプルー溶液と 1 : 1 の割合で混和し、血球計算盤を用いて細胞濃度を計算
- 6) 4) の懸濁液を 2.0×10^5 cells/ mL に希釈し、2 mL/ dish の量で播種
- 7) 37°C 5%CO₂ に設定したインキュベーターに 24 時間静置
- 8) 新たに用意した 35 mm ポリスチレンディッシュに無血清培地 450 μ L と Cell Counting Kit-8 を 50 μ L を混和する。
- 9) 細胞を播種したディッシュは PBS(-) 1 mL で 2 回洗浄し、PTFE コートガラス等の基材を細胞接着面を下にして 8) の容器に入れ、37°C 5%CO₂ で 30 分間インキュベート。ポリスチレンディッシュに播種したものを標準コントロールとし、細胞を播種しないポリスチレンディッシュをバックグラウンドとし、PBS で洗浄後に 8) と同じ溶液を 500 μ L 添加した。
- 10) 9) の溶液を 96 well プレート (TR5003) に 100 μ L ずつ 4 well に入れ、450 nm の吸光度を Sunrise™ RAINBOW を用いて測定

11) 吸光度を標準コントロールに対する割合で評価

2.2.7. 蛍光染色

生細胞を 10 μ M の 5- or 6-(N-succinimidylloxycarbonyl) fluorescein 3',6'-diacetate (CSFE, 341-07401, 株式会社 同仁化学研究所, 熊本)、死細胞を 1 μ g/mL の propidium iodide (PI, 343-07461, 株式会社 同仁化学研究所, 熊本) で染色し、倒立蛍光顕微鏡 (DP80, オリンパス株式会社, 東京) で観察し、位相差像および蛍光像を得た。

2.2.8. 統計学的処理

データは平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。多重比較検定は一元配置分散分析後に Scheffe's 検定で行った。 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

2.3. 結果および考察

2.3.1. PTFE コートガラスの構造および外観

PTFE コートガラスの構造を Fig. 1a に示した。カバーガラスの厚さは規格 No.1 (0.12~0.17 mm) のものを用いて、その表面に 7~10 μm の PTFE 塗膜を施した。

カバーガラス、PTFE コートガラス、PTFE ブロックの外観を Fig. 1b に示した。PTFE コートガラスは PTFE ブロックとは異なり、可視光が透過しており、下に敷いたキムタオル（日本製紙クレシア株式会社，東京）が確認できた。

このことから PTFE コートガラスを用いることで、PTFE 表面の透過光による観察が可能であると予測された。

2.3.2. 吸光スペクトルおよび光透過率評価

一般的に細胞の観察には、倒立顕微鏡が広く用いられている。これは作動距離の問題から、顕微鏡に用いられるレンズでは対象物との距離を短くする必要があるためである。このため、培養容器中の生細胞の観察には、細胞とレンズ間の距離を短くするために、細胞が接着している下方からの観察を行うことができる倒立顕微鏡を用いることが最適である。これは蛍光観察においても同様である。このため、PTFE コートガラスを用いることで倒立顕微鏡による蛍光観察が可能であるかを評価するために、PTFE コートガラスの吸光スペクトルを解析した。さらに得られた吸光スペクトルから光透過率を計算し PTFE ブロックと比較した。

PTFE コートガラス、PTFE ブロック、カバーガラスの光透過率を、吸光度計を用いて評価した。得られた 400 nm から 700 nm の吸光度を Fig. 2 に、吸光度の平均値から光透過率を計算し Table 2 に示した。この結果、PTFE コート

ガラスの吸光スペクトルは PTFE ブロックと同様に長波長側の吸光度が低い直線的な波形を示したが、光透過率は PTFE コートガラスでは約 74.9%であったのに対し、PTFE ブロックでは約 0.8%と 100 倍近い光透過率の向上が認められた。

このことから PTFE コートガラスを用いることで、位相差観察のみではなく、倒立顕微鏡を用いて PTFE 表面の蛍光観察が可能になると予測された。さらに、400 nm～700 nm の範囲においては特定の吸収波長を持たないため、多くの蛍光物質が使用可能であると予測される。

2.3.3. 細胞増殖抑制評価

PTFE コートガラスに使用された PTFE 塗膜が、PTFE ブロックと同様に細胞増殖抑制を示さないか、PTFE 浸漬培地で処理した後に細胞数を評価した。

PTFE 浸漬培地と通常の維持培地を比較した結果を Fig. 3 に示した。この結果、PTFE コートガラスに用いられている PTFE 塗膜は、PTFE ブロックと同様に細胞に対する細胞増殖抑制を示さないことが示唆された。

2.3.4. 細胞接着評価

PTFE が人工血管の素材として用いられる理由の一つが細胞非接着性である。このため、PTFE コートガラス表面が PTFE ブロックと同様に、細胞非接着性を示すか確認した。

PTFE コートガラス、PTFE ブロック、カバーガラスへの RAOEC の細胞接着数を評価し、Fig. 4a に示した。この結果、PTFE コートガラスには PTFE ブロックと同様に、RAOEC がほとんど接着しないことが示された。一方、ガラス表面には細胞接着が認められた。また、PTFE コートガラス表面の顕微鏡観察

において、未塗装部位は確認されなかった。

このことから、PTFE コートガラスは土台となったガラスの性質を示さずに、PTFE ブロックと同様に細胞と相互作用していることが示唆された。さらに PTFE コートガラス全体で細胞接着がほとんど確認されなかったことから、PTFE コートガラスのコート面全体が PTFE 塗膜で覆われており、少なくとも細胞接着に影響を与える大きさの未塗装箇所は存在しないことが示された。

2.3.5. PTFE コートガラスへの細胞接着に血漿が与える影響

先行研究では血漿が PTFE 表面に付着することで、細胞接着が可能になると報告されている (Grainger *et al.* 2003)。これは血漿中の接着分子の付着による影響であると考えられており、移植された人工血管における血栓形成や内皮化の制御において、重要な機構であると考えられる。このため細胞接着において、PTFE コートガラスへの血漿処理が、PTFE ブロックと同様の影響を示すか確認した。

血漿処理を施した PTFE コートガラス、PTFE ブロックへの RAOEC の細胞接着数を評価し、Fig. 4b に示した。この結果、PTFE コートガラスには PTFE ブロックと同様に、血漿処理により RAOEC が接着可能になることが示された。

このことから PTFE コートガラス表面には、PTFE ブロックと同様に血漿中の接着分子が付着し、それを介して細胞が接着することが示された。

2.3.6. PTFE コートガラス表面の位相差顕微鏡観察

倒立顕微鏡を用いて、PTFE コートガラス上の生細胞の位相差観察および蛍光観察が可能か、血漿処理をした PTFE コートガラスに RAOEC を播種し、24 時間後に観察した。

倒立顕微鏡を用いて撮影した画像を Fig. 5 に示した。この結果、PTFE コートガラス表面は、PTFE ブロックと異なり透過光による観察が可能であることが確認された。Fig. 5c では、PTFE コートガラス表面に接着した細胞が位相差観察により確認された。さらに、Fig. 5d では Fig. 5c と同視野で、蛍光染色した細胞の蛍光観察像を示した。

PTFE コートガラスを用いることで、PTFE 表面に接着した細胞の位相差観察が可能になったことから、PTFE 表面の生細胞の接着形態や遊走の評価が極めて容易になった。特に、位相差観察では蛍光観察と異なり消光による時間制限がないため、長期間における細胞観察が容易となる。PTFE 表面そのものには細胞が接着しにくいことから、何らかの接着分子を介した細胞接着においてはその安定性が重要となる。先行研究では、PTFE に接着した細胞数をエンドポイントでのみ評価していた (Pu *et al.* 1991, Grainger *et al.* 2003, Sprague *et al.* 2005)。本章では、作製した PTFE コートガラスを用いることで、経日的に連続的に細胞を観察し、これまで不明瞭であった PTFE 表面の接着細胞の安定性を解析することが可能になることが示された。さらに位相差観察と同視野で蛍光観察を行い、CSFE ($\lambda_{\text{ex}} = 496 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 516 \text{ nm}$) と PI ($\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$) のどちらも検出可能であることが示された。このため、これらの波長に近い蛍光特性を持つ蛍光タンパク質である緑色蛍光タンパク質 (EGFP, $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ 、 $\lambda_{\text{em}} = 509 \text{ nm}$) 融合タンパク質や、その他の蛍光プローブなどを用いたタンパク質の細胞内局在の解析なども可能であると予測される。一方、人工血管はその立体構造も血栓形成などに関与すると言われていたが (Suckow *et al.* 2013)、これは PTFE コートガラスを用いる場合は評価することができない。このため PTFE コートガラスは、PTFE 表面に付着した接着分子の影響など、細胞接着機構の基礎的な解析に有用であると考えられる。

また細胞培養を用いた実験では、血漿処理と細胞播種後の時間を合わせて 48 時間程度要したが、実験中に PTFE コートガラスの PTFE 塗膜に大きな傷や剥離などは確認されなかった。このため、一般的な培養実験における使用には問題のない強度を持つと考えられる。しかし、一般的に硬さの指標となるロックウェル硬度は、PTFE では R20 であるが、マイクロピペットなどに使用されるポリプロピレンは R80~R100 と PTFE よりも硬い。このためスクラッチアッセイの際に、ポリプロピレン製品で細胞を剥離すると PTFE 塗膜を傷つける可能性がある。このため、このような実験系においては PTFE 塗膜を傷つけない素材を用いることが必要となるだろう。

2.4. 結論

本章の実験により、PTFE コートガラスを用いることで、これまで困難であった PTFE 表面の細胞の位相差顕微鏡による観察が可能となることを示した。特に生細胞の長期間の連続観察も可能となったことから、PTFE に接着した細胞の安定性についても解析することが可能である。

また、倒立顕微鏡を用いた蛍光観察にも成功したことから、蛍光タンパク質などを用いた様々なアプローチも可能になると予測される。

これらのことから PTFE コートガラスを用いることで、PTFE に対する細胞接着機構の解析が容易となり、それを制御する手法の研究にも貢献すると思われる。さらには将来、PTFE を素材に用いる体内移植型の医療機器の改良に繋がると考えられる。

3. PTFE 表面への細胞接着機構の解析および接着促進物質の探索

3.1. 序論

体内に移植された PTFE 製人工血管表面に対する血栓形成抑制や内皮細胞誘導は、人工血管の閉塞の抑制に繋がるため、いくつかのアプローチでの研究がなされている (Koveker *et al.* 1988, Tremoli *et al.* 1985)。血栓形成抑制においては、血小板の付着や活性化の抑制が重要となり、一方、内皮細胞誘導には細胞接着の促進や安定化が重要となる。しかし、これまでの研究の多くは生体への移植実験など比較的臨床に近い実験モデルを用いた報告であり、基礎的な PTFE と細胞の接着に関する報告は多くない。特に、人工血管に使用される PTFE チューブは、引き延ばすことで微細な孔を開け、機械的強度やガス透過性などを血管により近づけた延伸多孔質 PTFE (expanded PTFE, ePTFE) が使用されている。しかしながら、ePTFE 人工血管と細胞の接着機構は血流の影響など様々な要素が関与するため複雑となる (Boyd *et al.* 1988, Narita *et al.* 2008)。さらに、これまで述べてきたように PTFE 表面の生細胞の観察は、光透過率の低さから難しい。このため、PTFE 表面への血小板や内皮細胞の接着機構を基礎的なレベルで解析するためには、まず ePTFE ではなく PTFE を用いた研究が必要であり、本研究で開発した PTFE コートガラスを用いることで簡便に行うことができる。そこで得られる基礎的な知見が、人工血管を用いた応用的な研究に発展し、最終的に臨床レベルでの応用につながると考えられる。

人工血管の内皮細胞による裏打ち、つまり内皮化は血小板の付着を抑制し、血栓形成を抑制すると考えられている (Koveker *et al.* 1988, Tremoli *et al.* 1985)。ePTFE においても、内皮化させた人工血管の血小板抑制効果が報告されている (Koveker *et al.* 1991)。このため、ePTFE 製人工血管の内皮化を、抗

体、ヘパリン、オリゴヌクレオチドなどの分子によるコーティングで促進する手法が報告されている (Mrowczynski *et al.* 2014, Hoshi *et al.* 2013, Schleicher *et al.* 2012)。しかし、これらの分子はいずれも患者にとっては異物であり、サイトカインストームや血小板減少などの副作用が懸念される (Baroletti and Goldhaber 2006, Goodyear 2006)。一方、このような処理をしていない ePTFE 製人工血管においても、大口径であれば血管閉塞の前に内皮化が完了し、安定した人工血管となる (笠野 *et al.* 1994)。第 2 章で示した通り、PTFE は細胞と直接接着する性質は極めて小さいため、その間に血漿由来の接着分子などが介在することが必要である。このため、移植された ePTFE 製人工血管では血液や周囲の細胞由来の何らかの因子が、安定した内皮化に関与していると予測される。これらの分子は、生体内にもともと存在しているため、前述の副作用を引き起こす可能性が低いと予測される。

血中に存在する分子であるアルブミンやフィブロネクチンなどは PTFE 表面に付着する (Jenney and Anderson 2000)。また、ePTFE 製人工血管を用いた実験では、フィブロネクチンやラミニンのコーティングが内皮化を促進すると報告されている (Wijelath *et al.* 2010, Williams *et al.* 2011)。Grainger ら (2003) は 1mm 厚の PTFE ブロックを用いて、フィブロネクチンと血漿が血管内皮細胞の接着を可能にすると報告している。このため、血中接着分子が PTFE への細胞接着を促進すると予測されるが、その細胞接着の安定性に関する報告はほとんど無い。人工血管における内皮細胞の剥離は、血管内皮細胞による抗血栓性を失うことに繋がるため、細胞接着の安定性の検討は重要である。しかし、連続観察が行えない場合、内皮細胞の剥離と内皮化が極めて速いサイクルで起こっているのか、剥離がほとんど起こらないのか、つまり細胞接着の安定性を評価することが難しい。

一方、血中の接着分子は血小板の接着も誘導する可能性がある。血栓形成の過程において、血小板の膜タンパク質である glycoprotein (GP) Ib やインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ への von Willebrand Factor (vWV) やフィブリノゲンの結合が必要となる (Stephen 1993)。フィブリノゲンは、PTFE と血小板との接着を誘導することが報告されている (Safiullin *et al.* 2015)。しかし、フィブリノゲン以外にも、フィブロネクチンもインテグリン $\alpha_{IIb}\beta_3$ に結合しうるため (Stephen 1993)、内皮細胞接着を促進する分子が血小板の接着も促進する可能性がある。

接着分子に広く共通する構造として、アルギニン-グリシン-アスパラギン酸 (RGD) モチーフがあり、これが細胞表面のインテグリンと結合することで細胞の接着や活性化が起こる (Horton 1999)。これを利用して、RGD モチーフの競合的阻害ペプチドである RGD-セリン (RGDS) などを用いることで、インテグリンを介した細胞接着を抑制したり、接着機構を解析することが可能である (Aguzzi *et al.* 2010, McDonald *et al.* 2009, Kottke-Marchant *et al.* 1989)。本章では RGDS を用いることで、血漿を介した細胞の PTFE への接着がインテグリンを介したものか評価し、その機構を解析する。RGDS はインテグリンとフィブロネクチン、ヴィトロネクチン、コラーゲン、フィブリノゲンの結合は阻害するものの、vWF と GPIb の結合は阻害しない (Horton 1999, Johnson *et al.* 1991)。このため、RGDS は血管内皮細胞と PTFE の接着機構の解析に用い、血小板と PTFE の解析には使用しなかった。

以上のことから本章では、血液または血管細胞由来の分子を候補として、PTFE への内皮細胞接着を促進し、かつ血小板の接着を抑制する分子を探索することを目的とした。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 基材

2.2.1 と同じ PTFE コートガラスを使用した。

3.2.2. 細胞培養

2.2.3. と同様に行った。

3.2.3. 基材への血漿、血清処理

血漿処理は 2.2.5. と同様に行った。ただし血漿による細胞への増殖促進の影響を防ぐために、PBS 洗浄は一回から二回に変更した。

血清処理は以下の手順で行った。8~10 週齢の雄ラットにソムノペンチルをペントバルビタールナトリウムとして 75 mg/ g i.p. で投与し深麻酔をかけた。深麻酔下において腹部後大静脈から全採血し、室温で 45 分間静置し、4°C 1,600 g で 30 分遠心し、血清を得た。全採血後にラットは放血により安楽死させた。得られた血清は、ポアサイズ 0.22 μm のシリンジフィルター (025022S-SFNY, アズワン株式会社, 大阪) でろ過した後に使用した。血清を入れた 35 mm ポリスチレンディッシュ (TR4000) に、PTFE コートガラスおよび PTFE ブロックを浸漬させ、37°C で一昼夜静置することで PTFE 表面への血清処理を行った。血清処理後は PBS (-) で二回洗浄し、細胞接着評価に用いた。

3.2.4. 血漿を介した接着機構の解析

2.2.6. と同様に操作した。ただし、接着機構解析のために、50 μM の RGDS を無血清培地に溶解させ、細胞播種前に 37°C 5%CO₂ で 5 分間インキュベートした。

3.2.5. 基材へのタンパク質コーティング処理

ラット血清由来フィブロネクチン (BT-272S, フナコシ株式会社, 東京)、ラット血清由来ヴィトロネクチン (GP05, フナコシ株式会社, 東京)、ラット血清由来アルブミン (A6272, シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京)、マウス EHS 肉腫由来ラミニン (11 243 217 001, ロシュダイアグノスティックス株式会社, 東京)、豚皮由来ペプシン可溶化 Type I コラーゲン (Cellmatrix Type I-C, 新田ゼラチン株式会社, 大阪) を使用した。Koveker らの報告 (1991) と同様に 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製したタンパク質溶液を 35mm ポリスチレンディッシュ (TR4000) に入れ、PTFE コートガラスを浸漬させ、37°C で一昼夜静置することで PTFE 表面へのタンパク質コーティング処理を行った。処理後は PBS (-) で二回洗浄し、細胞接着評価に用いた。

3.2.6. PTFE コートガラスへの細胞接着評価

2.2.6. と同様に行った。

3.2.7. PTFE コートガラスへの血小板接着評価

8~10 週齢の雄ラットにソムノペンチルをペントバルビタールナトリウムとして 75 mg/kg i.p. で投与し深麻酔をかけた。深麻酔下において腹部後大静脈から全採血し、採血直後に 3.8%クエン酸ナトリウムを加え、遠心により血小板を得た。血小板を 3.2.4 および 3.2.5 の PTFE コートガラスに播種し、37°C で 90 分静置した後に血小板接着数を評価した。Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST (CK12, 株式会社 同仁化学研究所, 熊本) を使用して評価を行った。

プロトコールは以下の通りである

- 1) 血液と 3.8 %クエン酸ナトリウムを 1 : 9 の比率で混合
- 2) 23 °C 700 g 20 min 遠心し、上部の血小板層を回収
- 3) 2) を 23°C 5,000 g 1 min 遠心し、上清を回収し Platelets-Poor Plasma (PPP) とする
- 4) 3) の沈殿を 1 mL の PPP で懸濁し、Platelets-Rich Plasma (PRP) とする
- 5) PRP 10 μ L を 1 %シュウ酸アンモニウム 990 μ L で希釈し、血球計算盤を用いて血小板濃度を計算した。同時に血小板以外の細胞混入率が 1%未満であることを確認し、実験に用いた。
- 6) PRP を PPP で 0.5×10^8 cells/ mL に希釈し、2 mL/ well ずつ、PTFE コートガラスを置いた 35 mm ポリスチレンディッシュに播種
- 7) 37°C に設定したインキュベーターに 90 分静置
- 8) 新たに用意した 35 mm ポリスチレンディッシュで PBS (-)、Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST の Working Solution と Lysis Buffer をそれぞれ 310 μ L 、100 μ L、10 μ L ずつ混和する。
- 9) 血小板を播種したディッシュは PBS (-) 1.5 mL で 6 回洗浄し、PTFE コートガラスの血小板接着面を下にして 8) の容器に入れ、23 °C で 30 分間インキュベート。ポリスチレンディッシュに播種したものを標準コントロールとし、血小板を播種しないポリスチレンディッシュをバックグラウンドとし、PBS で洗浄後に 8) と同じ溶液を 420 μ L 添加した。
- 10) 9) に Cytotoxicity LDH Assay Kit-WST の Stop Solution を 50 μ L ずつ添加し、溶液を 96 well プレート (TR5003) に 100 μ L ずつ 4 well に入れ、490 nm の吸光度を Sunrise™ RAINBOW を用いて測定
- 11) 吸光度を標準コントロールに対する割合で評価

3.2.8. 経日的観察

35mm ポリスチレンディッシュ (TR4000) に、血漿、フィブロネクチンもしくはラミニン処理 PTFE コートガラスを置き、RAOEC を播種した。細胞接着に対する血清の影響を避けるために、無血清培地を使用した。播種 24 時間後からは細胞増殖を誘導するために、血清を含む培地 (維持培地) に交換し、経日的に位相差顕微鏡 (IX70, オリンパス株式会社, 東京) を用いて観察した。

プロトコールは以下の通りである。

- 1) サブコンフルエントに達した RAOEC を PBS (-) 5 mL で洗浄
- 2) 0.05%トリプシン 0.02% EDTA/PBS(-) 0.5 mL を添加し 37°C に加温
- 3) 細胞が剥がれたら維持培地 8.5 mL で懸濁し、100 g で 5 分間遠心
- 4) 維持培地を除き、無血清培地で懸濁
- 5) 懸濁液 10 μ L を無血清培地 90 μ L で希釈し、0.5%トリパンプルー溶液と 1 : 1 の割合で混和し、血球計算盤を用いて細胞濃度を計算
- 6) 4) の懸濁液を 2.0×10^5 cells/ mL に希釈し、2 mL/ dish の量で播種
- 7) 37°C 5%CO₂ に設定したインキュベーターに 24 時間静置
- 8) 維持培地に交換し、経日的に位相差顕微鏡で観察

3.2.9. 統計学的処理

データは平均値 \pm 標準誤差 (S.E.) で示した。多重比較検定は一元配置分散分析後に Scheffe's 検定で行った。 $p < 0.05$ のとき統計学的に有意であると判断した。

3.3. 結果および考察

3.3.1. 血漿を介した接着機構の解析

第2章で示したように、血漿が血管内皮細胞の PTFE への接着を誘導する。先行研究によると、フィブロネクチンやラミニンなどの接着分子が血管内皮細胞の PTFE への接着を促進すると報告されている (Wijelath *et al.* 2010, Williams *et al.* 2011)。フィブロネクチンやラミニンなどの接着分子が細胞接着を誘導する際には、これらの接着分子の RGD モチーフと細胞表面のインテグリンの結合が必要である (Horton 1999)。この RGD モチーフは他にもヴィトロネクチンやコラーゲンなどにも存在する (Horton 1999, Benoit *et al.* 2012)。このため、細胞と PTFE の血漿を介した接着において、RGD モチーフを持つ接着分子が関与していると予測し、PTFE コートガラスを用いて検討した。

RGD モチーフの競合的阻害ペプチドである RGDS を用いて、ポリスチレンおよび血漿処理 PTFE コートガラス上にラット大動脈内皮細胞 (RAOEC) を播種し 24 時間後の接着を評価した (Fig. 6)。Fig. 6a~d に位相差顕微鏡像を示し、Fig. 6e にその接着細胞数を示した。血漿処理 PTFE コートガラスでは、RGDS 処理により、多くの細胞が接着できず浮遊していた。浮遊細胞は球状の形態を示すため、接着細胞との区別が容易である。一方、ポリスチレンディッシュでは、血漿処理 PTFE コートガラスのような RGDS による大きな変化は認められなかった。接着細胞数の変動 (Fig. 6e) も位相差顕微鏡像と同様の傾向を示した。接着細胞数は血漿処理 PTFE コートガラスにおいて減少傾向が認められたものの、統計学的有意差は認められなかった。

位相差観察による結果から、PTFE への血漿を介した細胞接着は、血漿中の接着分子が RGD モチーフを介して誘導される可能性が示唆された。

3.3.2. 血中および血管壁の接着分子の関与

RGD モチーフを持つフィブロネクチン、ヴィトロネクチン、フィブリノゲンなどの分子が、細胞と PTFE の接着を誘導することが考えられる。そこで、血中や細胞外マトリクスに存在し、RGD モチーフを持つ分子として、フィブロネクチン、ヴィトロネクチン、フィブリノゲン、ラミニン、コラーゲンを選り、RAOEC と PTFE 及び血小板と PTFE の接着への関与を評価した。

接着分子で処理した PTFE コートガラスに RAOEC を播種し 24 時間後の位相差顕微鏡像を Fig. 7 で示し、Fig. 8a にその接着細胞数を示した。フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン処理を行った PTFE 表面では、ポリスチレンディッシュと同様に RAOEC が仮足を広げ接着することが観察された。細胞は一般的に、基質との接着が良好なときに仮足を広げるが、接着が不良の場合には仮足を伸ばせず浮遊する。このため PTFE 表面へは、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンを介して細胞が良好に接着することが示唆された。一方、ヴィトロネクチン、フィブリノゲン、アルブミン処理を行った PTFE 表面では細胞の接着がほとんど確認されなかった。PTFE 表面に接着した細胞数は、フィブロネクチン処理を行った場合が最も多く、ラミニンとコラーゲンは同程度であった (Fig. 8a)。

続いて、接着分子で処理した PTFE コートガラスに接着した血小板数を Fig. 8b に示した。有意差は無いもののラミニン処理を行った PTFE コートガラス表面への血小板接着はほとんど認められず、コラーゲンとフィブロネクチン処理は同程度の低値を示した。また、アルブミン処理は、フィブリノゲン処理と同様に血小板接着数が多い傾向を示した。

これらのことから、血管内皮細胞と PTFE の接着には血中および細胞外マトリクスに存在する接着分子である、フィブロネクチン、ラミニンやコラーゲン

が促進することが示された。さらに、これらの分子は PTFE 表面への血管内皮細胞の接着を促進するが、血小板の接着は抑制する傾向が示された。本章で用いた PTFE と、人工血管に用いられる ePTFE の化学構造は同一であるため、その表面における接着分子の細胞誘導効果は同様であると考えられる。このため、フィブロネクチン、ラミニンやコラーゲンは、ePTFE 製人工血管においても、血管内皮細胞を誘導しつつ血小板接着を抑制するという両面から、血栓形成抑制が可能であることが予測された。一方、アルブミン処理は血小板の接着や活性化を抑制するという報告があるが (Kottke-Marchant *et al.* 1989)、フィブロネクチン、ラミニンやコラーゲンと比較すると血小板接着を抑制しない傾向が見られた。この差は、Kottke-Marchant らの報告 (1989) ではフロー条件下での解析を行っているが、本実験では静止条件下で解析を行っていることが関与していると考えられる。一定以上の流速下ではアルブミンが関与した接着は抑制されるが、一定以下の流速ではアルブミンが血小板の接着を促す可能性が考えられる。つまり、良好な血流下では、アルブミン処理は血小板の接着を抑制することから、短期的には血小板の活性化を抑制し血栓予防に有用である (Kottke-Marchant *et al.* 1989)。一方、血流が静止した条件では、アルブミンによる血小板接着抑制は起こらずに、内皮細胞の接着が抑制される (Grainger *et al.* 2003)。内皮細胞が安定して接着しない人工血管では血栓形成や内膜肥厚のリスクがある (Tremoli *et al.* 1985, Koveker *et al.* 1988, 赤羽 *et al.* 1985)。このため、アルブミンの PTFE への付着は短期的には血栓形成抑制に有用であるが、長期的には内皮接着を抑制するため、血栓形成や内膜肥厚のリスクが増加する可能性がある。

3.3.3. 血漿と血清の細胞接着への影響

3.3.2 よりフィブリノゲンは、細胞の PTFE への接着に単独では関与せず、血小板の PTFE への接着を促進する傾向が示された。一方、フィブロネクチンは細胞の PTFE への接着を促進し、血小板の PTFE への接着を抑制する傾向が示された。血漿中にはフィブリノゲンとフィブロネクチンがともに含まれているが、血清中にはフィブリノゲンが含まれずに、フィブロネクチンが含まれる (Tsai *et al.* 2002)。これらのことから、PTFE 表面への血清処理が血小板接着を抑制しつつ、血管内皮細胞の接着を促進しうると予測し、PTFE コートガラスを用いて評価した。

血漿あるいは血清処理を施した PTFE コートガラスに RAOEC を播種し、24 時間後の位相差顕微鏡像を Fig. 9 で示した。血漿あるいは血清を採取したラットの個体によるバラツキがあるものの、血漿処理では仮足を広げ接着した細胞が確認された。一方、血清処理では、PTFE 表面に接着しているものの、ほとんどの細胞は仮足を広げていなかった。接着した細胞数を測定し Fig. 10 a に示した。血漿と血清処理はともに、溶媒コントロールと比較して有意に細胞接着を促進したが、血清処理は血漿処理よりも接着細胞数が有意に少なかった。

続いて、血漿および血清処理を施した PTFE コートガラスに接着した血小板数を算出し、Fig. 10 b に示した。血漿や血清処理はともに、溶媒コントロールと比較して有意に血小板接着を抑制した。血清処理は、血漿処理よりも血小板接着が少ない傾向であったが、有意差は認められなかった。

本実験結果から、血清処理は血漿処理よりも血小板の接着数が少ない傾向が認められ、血管内皮細胞の接着数は有意に少なくなることが示された。このため血清処理は、PTFE の血管内皮細胞の接着を誘導し、血小板の接着を抑制する目的としては、有効ではないと考えられた。ただし、血小板接着はフィブリノゲンではなく、アルブミンを介している可能性があり、血清処理 PTFE では、

血漿処理や無処理の場合よりも血小板の活性化が遅い可能性が考えられる。

RAOEC の接着数において、血清処理が血漿処理よりも有意に低値を示した要因として、フィブリンがフィブロネクチンと複合体を形成するため (Pupek *et al.* 2016, Lemanska-Perek *et al.* 2016)、本実験において血漿中のフィブリノゲンが、PTFE への血漿処理の過程でフィブリンとなりフィブロネクチンの PTFE 表面への吸着を促進したというフィブリノゲンの間接的な関与が考えられる。この予測された機構は、実験動物を用いた研究での、PTFE 製人工血管への内皮化はフィブリン膜上で起こるという所見と一致する (笠野ら, 1994)。

3.3.4. PTFE 表面に接着した細胞の経日観察

これまでの結果から、血漿、フィブロネクチン、ラミニンおよびコラーゲンが PTFE 表面への細胞接着を誘導することが示され、フィブロネクチンが最も有効であった。血小板付着抑制も考慮するとラミニンも PTFE 製人工血管の血栓抑制に有効であると考えられる。人工血管への応用を考える上で、血管内皮細胞の安定的な接着や増殖の研究は重要である。しかしながら、先行研究では生細胞の PTFE 表面での連続観察が行われておらず、接着安定性や増殖性は明らかになっていない。

このため、PTFE コートガラスを血漿、フィブロネクチン、ラミニンおよびコラーゲンで処理し、RAOEC を播種した後に連続的に位相差顕微鏡を用いて観察した。その結果を Fig. 11 に示した。播種 1 日後は血漿、フィブロネクチン、ラミニンまたはコラーゲン処理した PTFE 表面では RAOEC が仮足を広げ接着した。3 日後には、フィブロネクチンおよびラミニン処理では細胞が PTFE 表面を覆い、増殖の余地が無くなり 7 日間にわたりコンフルエントを維持した。一方、血漿およびコラーゲン処理では、増殖は認められず、7 日以内にほぼ全て

の細胞が剥離した。

これらのことから、フィブロネクチン処理やラミニン処理は、PTFE 表面における細胞接着の安定性や細胞増殖を促進することが示され、これらは PTFE 製人工血管において安定な内皮化に繋がると予測される。一方、血漿処理後の PTFE 表面には細胞が接着するものの、不安定であり数日で剥がれた。本実験で用いられた PTFE と人工血管に用いられる ePTFE の化学構造が同一であるため、移植された ePTFE 製人工血管においても同様のことが起こっていると予測される。つまり、ePTFE 製人工血管には血中の接着分子を介して血管内皮細胞が接着するものの、その接着は不安定であり内皮化がスムーズに進行しないと考えられる。実際、長さ 3 cm の ePTFE 製人工血管において、内皮化が完了するまで 3~6 ヶ月程度かかるとの報告もある（笠野ら, 1994）。本実験では、PTFE 表面へのフィブロネクチン処理やラミニン処理が、血漿処理よりも細胞接着の安定性が高いことが示された。このため、フィブロネクチン処理やラミニン処理により、内皮化形成の期間が短縮される可能性がある。また、コラーゲン処理は 1 日後ではラミニン処理とほぼ同等の接着であったが、7 日以内に大きな違いが認められた。

3.4. 結論

本章の実験では、PTFE コートガラスを用いて PTFE 表面の細胞を経日的に観察し、その接着の安定性を評価した。PTFE 表面への血漿やコラーゲンを介した細胞接着は、接着分子であるフィブロネクチンやラミニンを介するものと比較して不安定であることが示された。また、フィブリノゲンの間接的な関与も示唆された。このことから、移植された PTFE 製人工血管では血中の分子を介して、血管内皮細胞が不安定な接着と剥離を繰り返し、フィブリノゲンの足

場が形成されると、そこに接着するフィブロネクチンを介して安定した細胞接着が起こり、数ヶ月かけて内皮化を完了させると考えられた。

また、フィブロネクチンやラミニンは、フィブリノゲンの足場を介さずに PTFE と血管内皮細胞の増殖や安定な接着を誘導し、さらに血小板の接着を抑制する可能性が示された。この血管内皮細胞と血小板の接着の両面から、フィブロネクチンやラミニンが内皮化を介して PTFE 製人工血管の血栓形成を抑制することが示唆された。実験動物モデルを用いた研究でのフィブロネクチンやラミニンの内皮化への有用性が示されていたが、その機構に血管内皮細胞の安定した接着と、血小板の接着抑制が関与している可能性が示された。

4. 総括

本研究では、カバーガラスに 10 μm 以下の膜厚で PTFE をコーティングした PTFE コートガラスを開発し、これまで困難であった PTFE 表面の位相差顕微鏡観察を可能にした。PTFE コートガラスは、従来の研究で用いられていた PTFE ブロックと同等の細胞接着性を示すことから、PTFE 表面への細胞接着機構の解析に利用可能であることが示された（第 2 章）。PTFE 表面への血管内皮細胞の接着は、血中の接着分子であるフィブロネクチンや、細胞外マトリクスであるラミニンやコラーゲンが誘導することが示され、フィブロネクチンが最も高値を示した。PTFE 表面への血小板の接着は、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンで低値の傾向を示し、有意では無いがラミニンが最低値を示した。血漿も PTFE 表面への血管内皮細胞の接着を誘導し、血小板接着を抑制した。PTFE コートガラスを用いて、位相差顕微鏡で経日的な細胞の増殖や接着安定性を評価した。この結果、フィブロネクチンとラミニンでは 7 日間に渡り、安定した細胞増殖が観察され、PTFE 表面の内皮化が完了した。一方、血漿は安定した細胞接着を誘導できず、7 日後にはほとんどの細胞が PTFE 表面から剥離した。このことから、移植された PTFE 製人工血管では、その表面に血中の接着分子を介して細胞が接着するが、細胞接着は不安定であり、接着と剥離が繰り返すことで、内皮化がゆっくりと進むことが示唆された。一方、フィブロネクチンやラミニンは、血管内皮細胞の安定した接着による早期の内皮化を可能にし、また血小板の接着を抑制するという両面から、PTFE 製人工血管の血栓形成を抑制することが示唆された（第 3 章）。

本研究により開発された PTFE コートガラスを用いることで、PTFE 表面の細胞の位相差顕微鏡観察が容易となったため、細胞の安定性についてより長期

間解析することも可能である。また、蛍光観察にも成功したことから、蛍光免疫染色や蛍光タンパク質などを用いた様々なアプローチも可能になると予測される。これらのことから PTFE コートガラスを用いることで、PTFE に対する細胞接着機構の解析や、それを制御する手法の研究が進展することが期待される。本研究では静止条件下のみで解析したが、人工血管への応用を想定した場合、ずり応力による影響を、フローチャンバー等を用いて解析する必要がある。この場合においても、チャンバーのサイズに適合するガラスに PTFE コーティングを施すことで、PTFE 表面の位相差観察が可能だと考えられる。これらの研究が、PTFE を素材に用いる体内移植型の医療機器の改良に繋がると考えられる。

本論文の一部は以下の論文に公表した。

Inukai N., Tanaka K., Takizawa T.: A convenient technique for live-cell imaging on the surface of polytetrafluoroethylene with a phase-contrast microscope. *Microscopy*. in press.

5. 謝辞

本論文をまとめるにあたり御指導を頂きました、麻布大学獣医学部薬理学研究室、浅井史敏教授、麻布大学獣医学部生理学第二研究室、折戸謙介教授、麻布大学獣医学部動物工学研究室、田中和明准教授ならびに麻布大学獣医学部動物工学研究室、滝沢達也教授に深く感謝の意を表します。

本研究を行うにあたり、御指導と御鞭撻を賜りました麻布大学獣医学部動物工学研究室、田中和明准教授、麻布大学獣医学部動物工学研究室共同研究員、宮崎陽子博士ならびに麻布大学獣医学部動物工学研究室、滝沢達也教授に深く感謝の意を表します。

本実験を遂行するために貴重な命を捧げてくれた多くの実験動物の冥福を祈るとともに、深く感謝いたします。

また、本研究を行うにあたり、多大なるご協力を頂いた麻布大学獣医学部動物工学研究室内の皆様方に厚くお礼を申し上げます。

6. 引用文献

Aguzzi, M. S., P. Fortugno, C. Giampietri, G. Ragone, M. C. Capogrossi, and A. Facchiano. "Intracellular Targets of Rgds Peptide in Melanoma Cells." *Mol Cancer* 9 (2010): 84.

Baroletti, S. A., and S. Z. Goldhaber. "Heparin-Induced Thrombocytopenia." *Circulation* 114, no. 8 (2006): e355-6.

Benoit, Y. D., J. F. Groulx, D. Gagne, and J. F. Beaulieu. "Rgd-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt." *J Signal Transduct* 2012 (2012): 248759.

Benoit, Y. D., J. F. Groulx, D. Gagne, and J. F. Beaulieu. "Rgd-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt." *J Signal Transduct* 2012 (2012): 248759.

Boyd, K. L., S. Schmidt, T. R. Pippert, S. A. Hite, and W. V. Sharp. "The Effects of Pore Size and Endothelial Cell Seeding Upon the Performance of Small-Diameter E-Ptfe Vascular Grafts under Controlled Flow Conditions." *J Biomed Mater Res* 22, no. 3 (1988): 163-77.

Goodyear, M. "Learning from the Tgn1412 Trial." *BMJ* 332, no. 7543 (2006): 677-8.

Grainger, D. W., G. Pavon-Djavid, V. Migonney, and M. Josefowicz. "Assessment of Fibronectin Conformation Adsorbed to Polytetrafluoroethylene Surfaces from Serum Protein Mixtures and Correlation to Support of Cell Attachment in Culture." *J Biomater Sci Polym Ed* 14, no. 9 (2003): 973-88.

Horton, M. A. "Arg-Gly-Asp (Rgd) Peptides and Peptidomimetics as Therapeutics: Relevance for Renal Diseases." *Exp Nephrol* 7, no. 2 (1999): 178-84.

Hoshi, R. A., R. Van Lith, M. C. Jen, J. B. Allen, K. A. Lapidos, and G. Ameer.

"The Blood and Vascular Cell Compatibility of Heparin-Modified Eptfe Vascular Grafts." *Biomaterials* 34, no. 1 (2013): 30-41.

Jenney, C. R., and J. M. Anderson. "Adsorbed Serum Proteins Responsible for Surface Dependent Human Macrophage Behavior." *J Biomed Mater Res* 49, no. 4 (2000): 435-47.

Johnson, P. C., R. A. Sheppeck, S. R. Hribar, M. L. Bentz, J. Janosky, and C. S. Dickson. "Inhibition of Platelet Retention on Artificial Microvascular Grafts with Monoclonal Antibodies and a High-Affinity Peptide Directed against Platelet Membrane Glycoproteins." *Arterioscler Thromb* 11, no. 3 (1991): 552-60.

Kaibara, M., and Y. Kawamoto. "Rheological Measurement of Blood Coagulation in Vascular Vessel Model Tube Consisting of Endothelial Cells Monolayer." *Biorheology* 28, no. 3-4 (1991): 263-74.

Kawakami, S., M. Kaibara, Y. Kawamoto, and K. Yamanaka. "Rheological Approach to the Analysis of Blood Coagulation in Endothelial Cell-Coated Tubes: Activation of the Intrinsic Reaction on the Erythrocyte Surface." *Biorheology* 32, no. 5 (1995): 521-36.

Kottke-Marchant, K., J. M. Anderson, Y. Umemura, and R. E. Marchant. "Effect of Albumin Coating on the in Vitro Blood Compatibility of Dacron Arterial Prostheses." *Biomaterials* 10, no. 3 (1989): 147-55.

Koveker, G. B., W. E. Burkel, L. M. Graham, T. W. Wakefield, and J. C. Stanley. "Endothelial Cell Seeding of Expanded Polytetrafluoroethylene Vena Cava Conduits: Effects on Luminal Production of Prostacyclin, Platelet Adherence, and Fibrinogen Accumulation." *J Vasc Surg* 7, no. 4 (1988): 600-5.

Koveker, G. B., L. M. Graham, W. E. Burkel, R. Sell, T. W. Wakefield, K. Dietrich, and J. C. Stanley. "Extracellular Matrix Preparation of Expanded Polytetrafluoroethylene Grafts Seeded with Endothelial Cells: Influence on Early Platelet Deposition, Cellular Growth, and Luminal

Prostacyclin Release." *Surgery* 109, no. 3 Pt 1 (1991): 313-9.

Lemanska-Perek, A., D. Krzyzanowska-Golab, M. Pupek, P. Klimeczek, W. Witkiewicz, and I. Katnik-Prastowska. "Analysis of Soluble Molecular Fibronectin-Fibrin Complexes and Eda-Fibronectin Concentration in Plasma of Patients with Atherosclerosis." *Inflammation* 39, no. 3 (2016): 1059-68.

McDonald, D. M., G. Coleman, A. Bhatwadekar, T. A. Gardiner, and A. W. Stitt. "Advanced Glycation of the Arg-Gly-Asp (Rgd) Tripeptide Motif Modulates Retinal Microvascular Endothelial Cell Dysfunction." *Mol Vis* 15 (2009): 1509-20.

Mrowczynski, W., A. Rungatscher, F. Buchegger, J. C. Tille, S. Namy, O. Ratib, M. Kutryk, and B. H. Walpoth. "Biological Effects of Anti-Cd34-Coated Eptfe Vascular Grafts. Early in Vivo Experimental Results." *Kardiochir Torakochirurgia Pol* 11, no. 2 (2014): 182-90.

Naoum, J. J., and E. J. Arbid. "Bypass Surgery in Limb Salvage: Polytetrafluoroethylene Prosthetic Bypass." *Methodist Debaque Cardiovasc J* 8, no. 4 (2012): 43-6.

Narita, Y., H. Kagami, H. Matsunuma, Y. Murase, M. Ueda, and Y. Ueda. "Decellularized Ureter for Tissue-Engineered Small-Caliber Vascular Graft." *J Artif Organs* 11, no. 2 (2008): 91-9.

Peck, M., D. Gebhart, N. Dusserre, T. N. McAllister, and N. L'Heureux. "The Evolution of Vascular Tissue Engineering and Current State of the Art." *Cells Tissues Organs* 195, no. 1-2 (2012): 144-58.

Pu, F. R., R. L. Williams, T. K. Markkula, and J. A. Hunt. "Effects of Plasma Treated Pet and Ptfе on Expression of Adhesion Molecules by Human Endothelial Cells in Vitro." *Biomaterials* 23, no. 11 (2002): 2411-28.

Pupek, M., R. Pawlowicz, K. Lindner, D. Krzyzanowska-Golab, A. Lemanska-Perek, B. Panaszek, and I. Katnik-Prastowska. "Occurrence of Fibronectin-Fibrin Complexes in Plasma of Patients with

Multimorbidity Due to the Inflamm-Aging Phenomenon." *Exp Gerontol* 77 (2016): 19-28.

Roy-Chaudhury, P., M. El-Khatib, B. Campos-Naciff, D. Wadehra, K. Ramani, M. Leesar, M. Mistry, Y. Wang, J. S. Chan, T. Lee, and R. Munda. "Back to the Future: How Biology and Technology Could Change the Role of Ptfе Grafts in Vascular Access Management." *Semin Dial* 25, no. 5 (2012): 495-504.

Safiullin, R., W. Christenson, H. Owaynat, I. S. Yermolenko, M. K. Kadirov, R. Ros, and T. P. Ugarova. "Fibrinogen Matrix Deposited on the Surface of Biomaterials Acts as a Natural Anti-Adhesive Coating." *Biomaterials* 67 (2015): 151-9.

Schleicher, M., J. Hansmann, B. Elkin, P. J. Kluger, S. Liebscher, A. J. Huber, O. Fritze, C. Schille, M. Muller, K. Schenke-Layland, M. Seifert, H. Walles, H. P. Wendel, and U. A. Stock. "Oligonucleotide and Parylene Surface Coating of Polystyrene and Eptfe for Improved Endothelial Cell Attachment and Hemocompatibility." *Int J Biomater* 2012 (2012): 397813.

Sprague, E. A., and J. C. Palmaz. "A Model System to Assess Key Vascular Responses to Biomaterials." *J Endovasc Ther* 12, no. 5 (2005): 594-604.

Stegemann, J. P., S. N. Kaszuba, and S. L. Rowe. "Review: Advances in Vascular Tissue Engineering Using Protein-Based Biomaterials." *Tissue Eng* 13, no. 11 (2007): 2601-13.

Stephen, R. H. "Device Thrombosis and Thromboembolism." *Cardiovasc Pathol*, no. 2 (1993): 157-65.

Suckow, B. D., L. W. Kraiss, D. H. Stone, A. Schanzer, D. J. Bertges, D. T. Baril, J. L. Cronenwett, and P. P. Goodney. "Comparison of Graft Patency, Limb Salvage, and Antithrombotic Therapy between Prosthetic and Autogenous Below-Knee Bypass for Critical Limb Ischemia." *Ann Vasc Surg* 27, no. 8 (2013): 1134-45.

Tremoli, E., E. A. Jaffe, K. T. Goldman, and B. B. Weksler. "Prostacyclin Production by Endothelial Cells. Effects of Sera from Normal and Hyperlipidemic Subjects." *Arteriosclerosis* 5, no. 2 (1985): 178-85.

Tsai, W. B., J. M. Grunkemeier, C. D. McFarland, and T. A. Horbett. "Platelet Adhesion to Polystyrene-Based Surfaces Preadsorbed with Plasmas Selectively Depleted in Fibrinogen, Fibronectin, Vitronectin, or Von Willebrand's Factor." *J Biomed Mater Res* 60, no. 3 (2002): 348-59.

Wijelath, E., T. R. Kohler, J. Murray, M. Namekata, M. Yagi, and M. Sobel. "Enhancement of Capillary and Cellular Ingrowth in Eptfe Implants with a Proangiogenic Recombinant Construct Derived from Fibronectin." *J Biomed Mater Res A* 95, no. 2 (2010): 641-8.

Williams, S. K., L. B. Kleinert, and V. Patula-Steinbrenner. "Accelerated Neovascularization and Endothelialization of Vascular Grafts Promoted by Covalently Bound Laminin Type 1." *J Biomed Mater Res A* 99, no. 1 (2011): 67-73.

笠野 泰生, 谷村 弘, 熊田 馨, 谷口 勝俊, 林堂 元紀, 中井 健裕. "消化器悪性腫瘍切除時の e-Ptfe 製人工血管による下大静脈再建の基礎的, 臨床的検討." *日本外科系連合学会誌* 19, no. 3 (1994): 70-74.

佐藤 正明, 大島 宣雄. "血栓形成と血流の変化の測定." *血栓止血誌* 1, no. 6 (1990): 556-561.

西岡 洋, 笹嶋 唯博, 直江 綾子, 久保 良彦. "吸収性縫合糸による eptfe 人工血管吻合の検討." *人工臓器* 20, no. 2 (1991): 535-539.

赤羽 紀武, 山本 敏雄, 氏家 久, 梅沢 和正, 三浦 金次, 養田 俊之, 桜井 健司. "E-Ptfe 人工血管の末梢側吻合部狭窄の発生機序とその予防について." *人工臓器* 14, no. 2 (1985): 967-970.

Table 1 The Structural formulas of the representative fluoropolymers

PTFE	Polytetrafluoroethylene
	$-(CF_2 - CF_2)_n-$
PVDF	Polyvinylidene difluoride
	$-(CF_2 - CH_2)_n-$
ETFE	Ethylene tetrafluoroethylene
	$-(CF_2 - CF_2)_m - (CH_2 - CH_2)_n -$
FEP	Fluorinated ethylene propylene
	$-(CF_2 - CF_2)_m - (CF_2 - CF)_n -$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad CF_3$
PFA	Perfluoro alkoxy alkane
	$-(CF_2 - CF_2)_m - (CF_2 - CF)_n -$ $\quad \quad \quad $ $\quad \quad \quad O - R_f$
PCTFE	Polychlorotrifluoroethylene
	$-(CF_2 - CCl)_n-$

Rf : Perfluoroalkyl groups

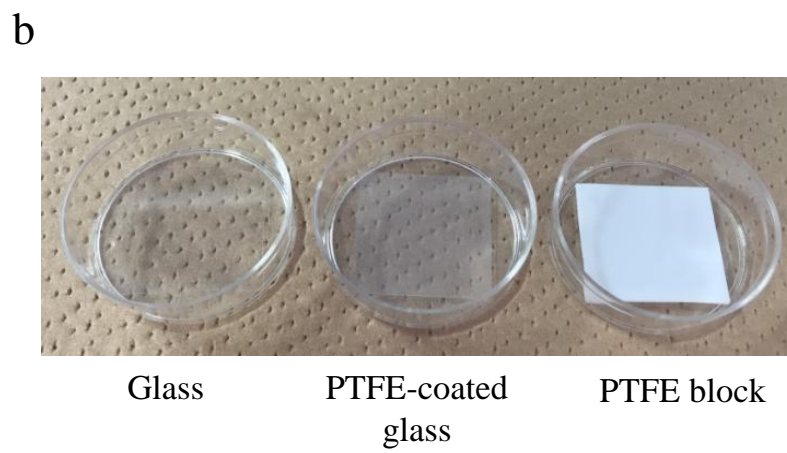
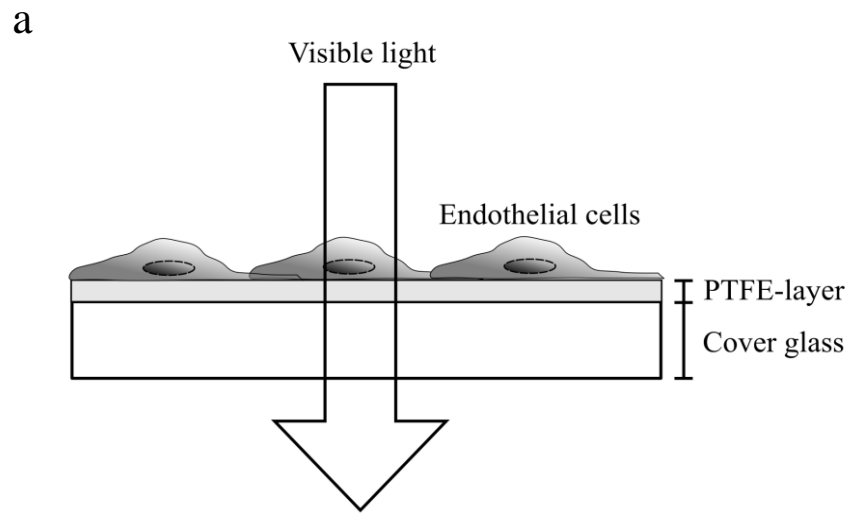


Fig. 1 (a) An image of the PTFE-coated glass. (b) The appearance of each material.

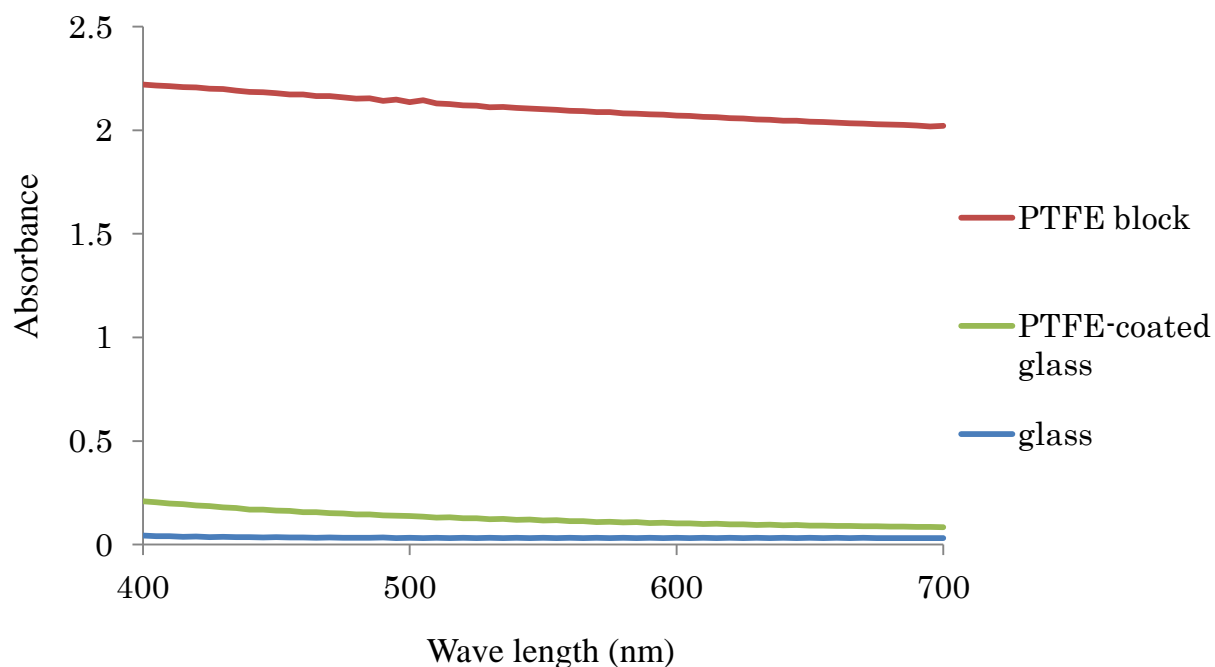


Fig. 2 The average absorbance spectrum of the PTFE-block, the PTFE-coated glass, and the glass used.

Table 2 The average of absorbance and optical transmittance of the materials used from 400 to 700 nm.

		PTFE block	PTFE-coated glass	glass
Absorbance	Mean	2.11	0.13	0.03
	S.E.	0.01	0.00	0.00
Optical transmittance	Mean	0.79	74.9	92.6
	S.E.	0.01	0.75	0.07

The data are presented as the mean \pm standard error (n = 3).

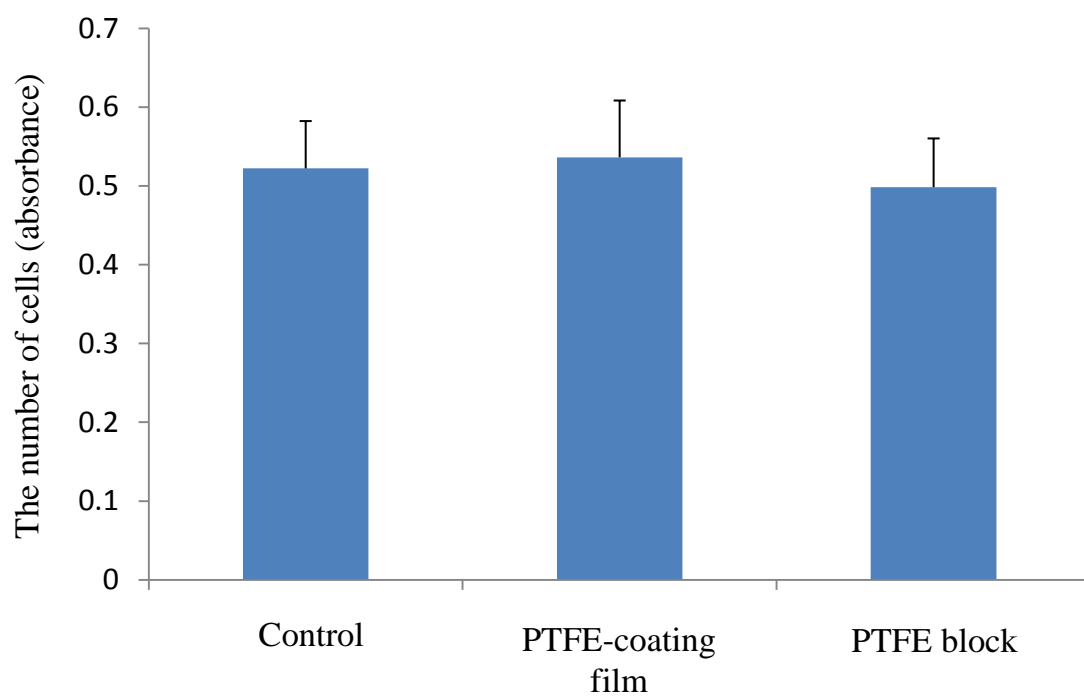


Fig. 3 The number of RAOEC after incubated for 24 h in the medium in which each material was previously soaked. The data are presented as the mean \pm standard error (n = 4).

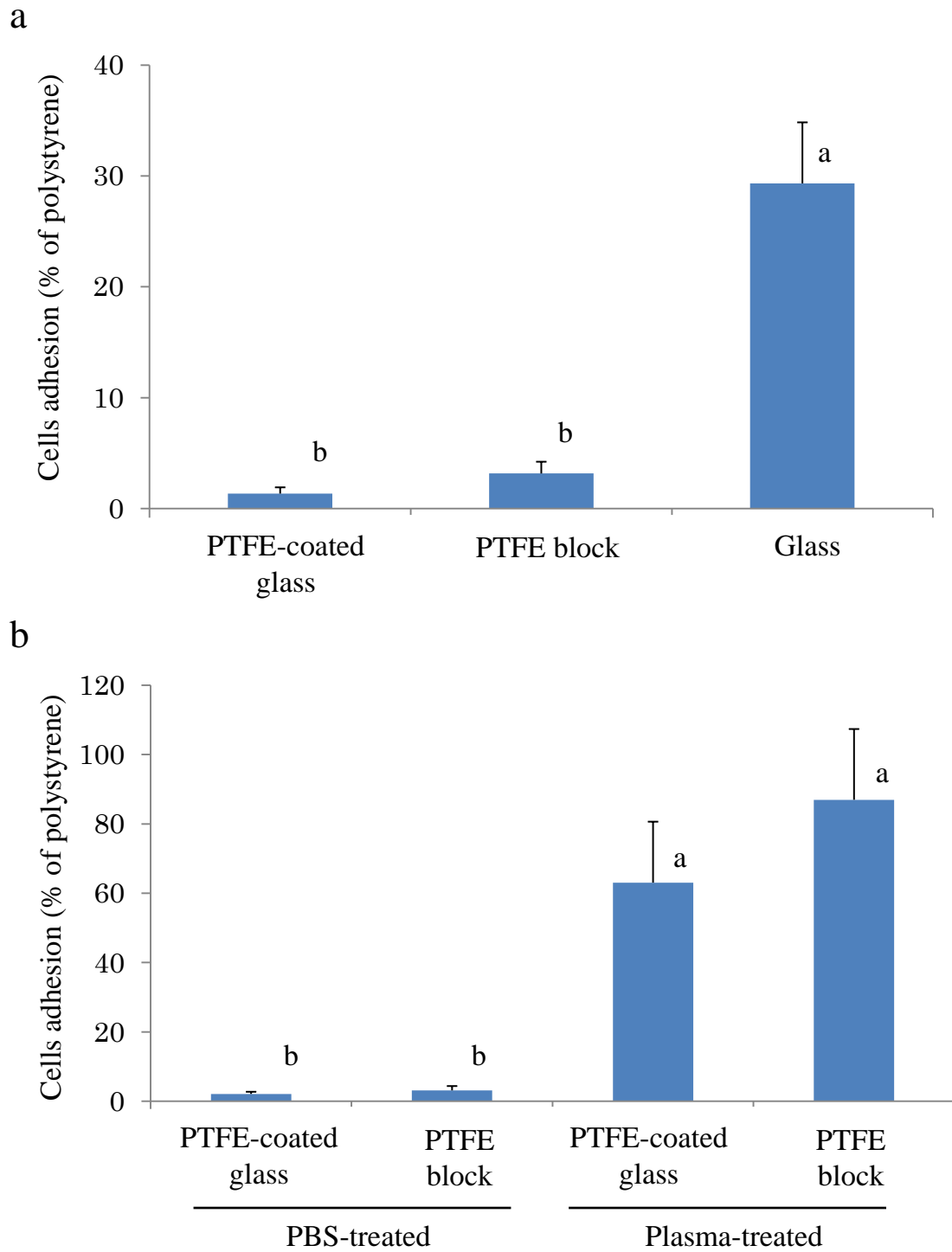


Fig. 4 Adhesion of RAOEC. (a) Adhesion of RAOEC to the surface of bare materials. (b) Adhesion of RAOEC to the surface of materials treated with plasma. The data are presented as the mean \pm standard error (n = 5). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

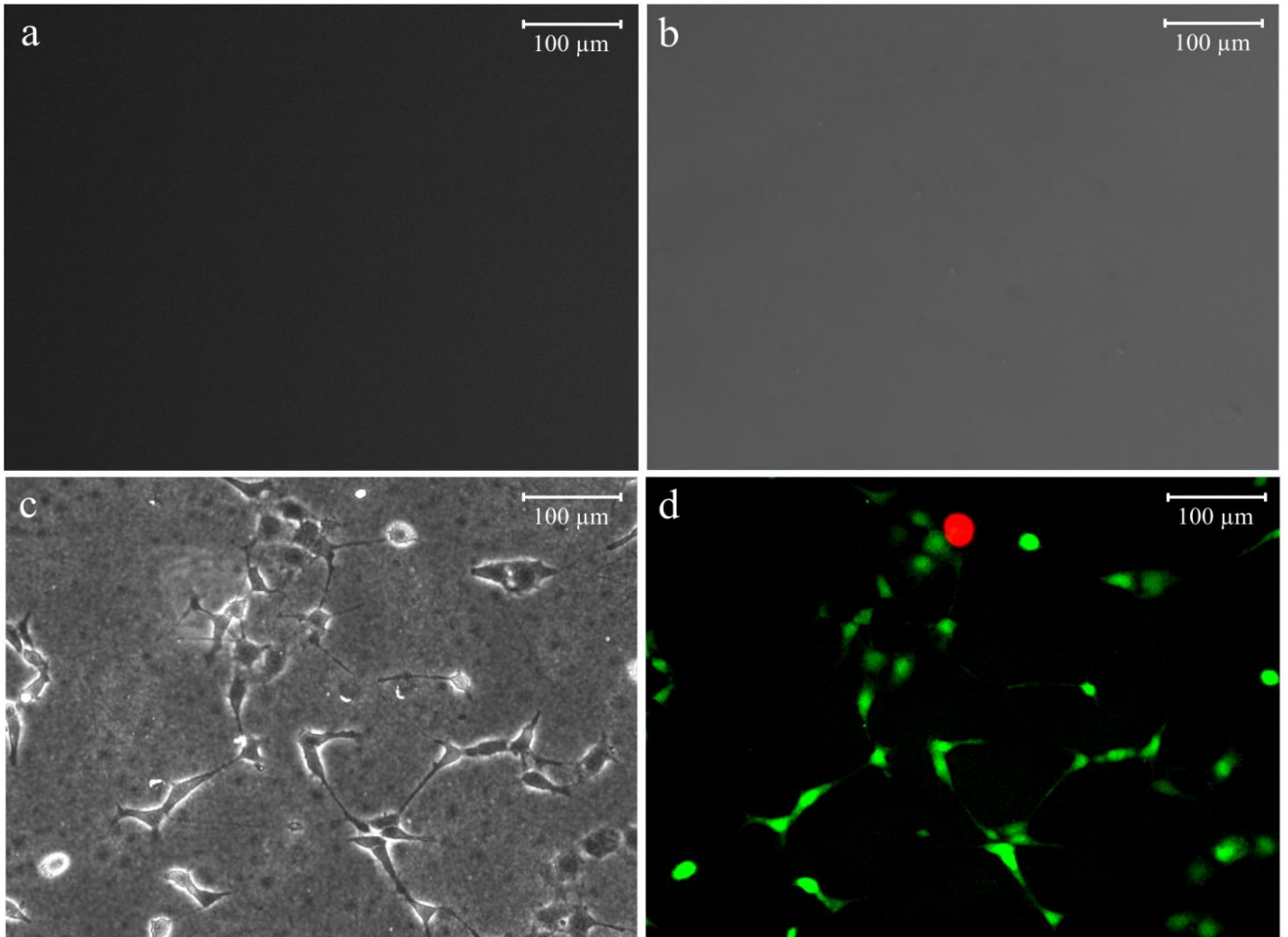


Fig. 5 A phase-contrast observation of living cells on the surface of PTFE.

(a) A phase-contrast microscopy image of the PTFE-block. (b) A phase-contrast microscopy image of the PTFE-coated glass. (c) A phase-contrast microscopy image of RAOEC. (d) A fluorescence microscopy image of RAOEC on the surface of the PTFE-coated glass. Living cells were stained with CSFE (green), and dead cells were stained with PI (red).

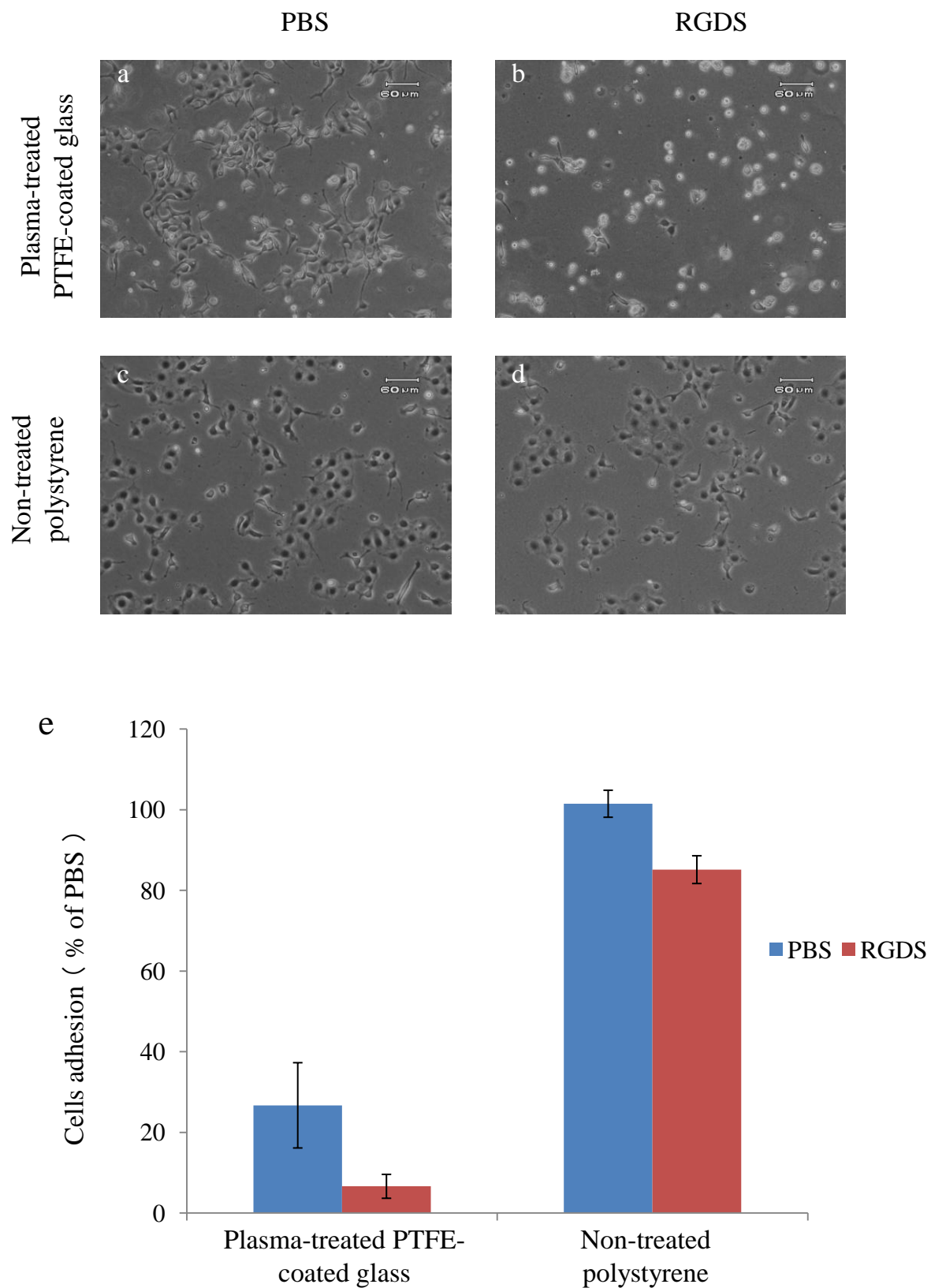


Fig. 6 (a, b) Representative images of the RAOEC on the surface of the PTFE-coated glass. (c, d) Representative images of the RAOEC on the surface of polystyrene. (e) Adhesion of RAOEC treated with RGDS to the surface of materials. The data are presented as the mean \pm standard error (n = 4).

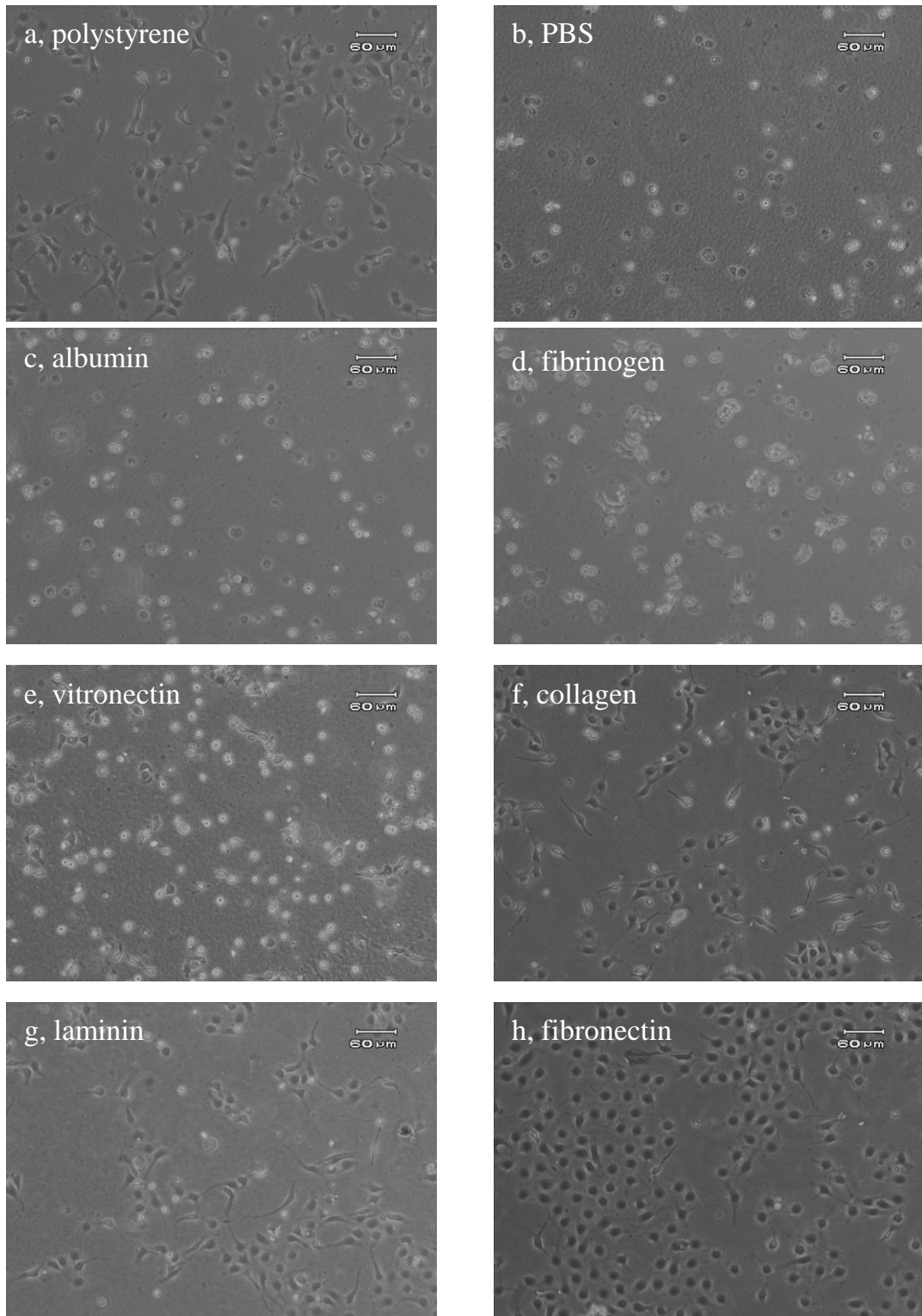


Fig. 7 (a) A representative image of the RAOEC on the surface of polystyrene. (b~h) Representative images of the RAOEC on the surface of the PTFE-coated glass treated with each protein, (b) PBS, (c) albumin, (d) fibrinogen, (e) vitronectin, (f) collagen, (g) laminin, (h) fibronectin.

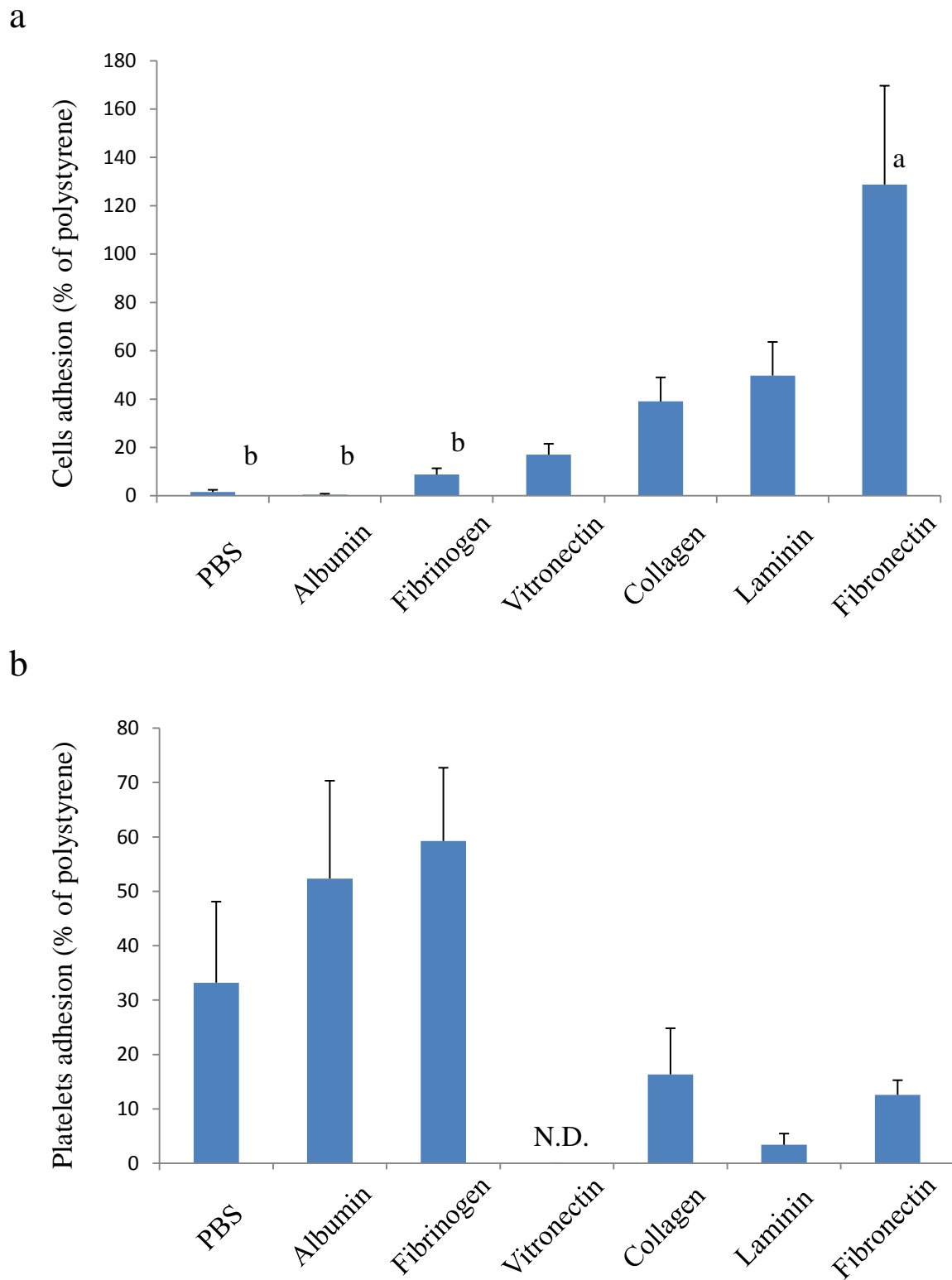


Fig. 8 (a) Adhesion of RAOEC to the surface of the PTFE-coated glass treated with each protein. (b) Adhesion of platelets to the surface of the PTFE-coated glass treated with each protein. The data are presented as the mean \pm standard error ($n = 4$). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

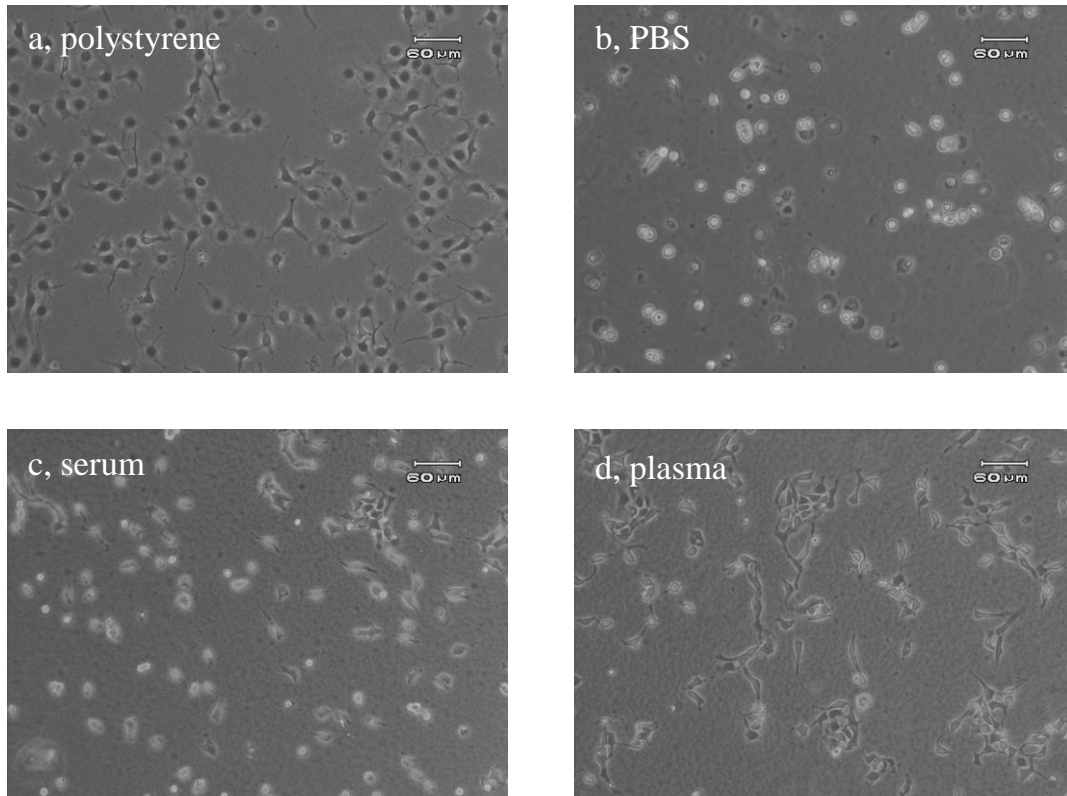


Fig. 9 (a) A representative image of the RAOEC on the surface of polystyrene. (b~d) Representative images of the RAOEC on the surface of the PTFE-coated glass treated with each solution, (b) PBS, (c) Serum, (d) Plasma,

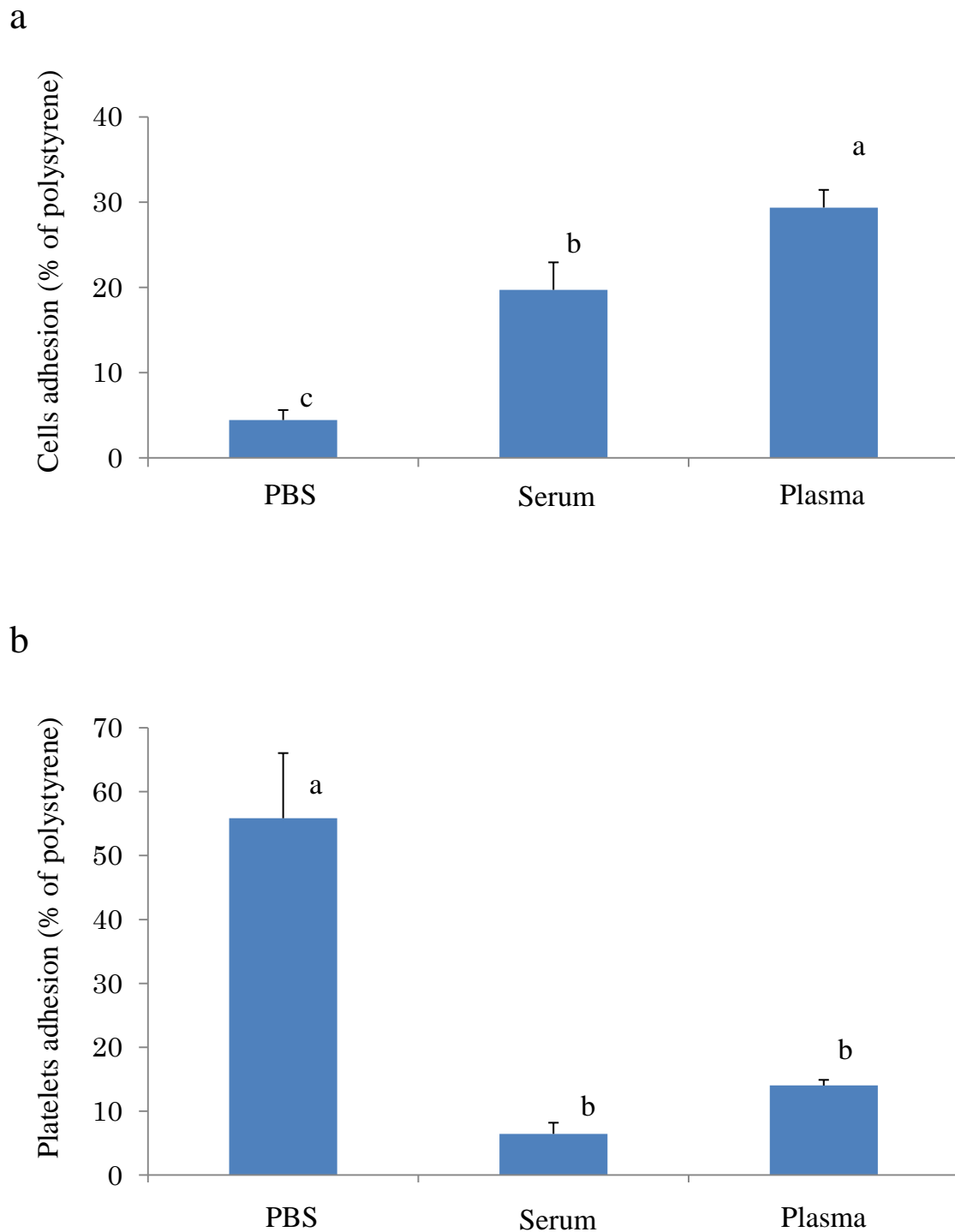


Fig. 10 (a) Adhesion of RAOEC to the surface of the PTFE-coated glass treated with each solution. (b) Adhesion of platelets to the surface of the PTFE-coated glass treated with each solution. The data are presented as the mean \pm standard error ($n = 4$). Bars with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

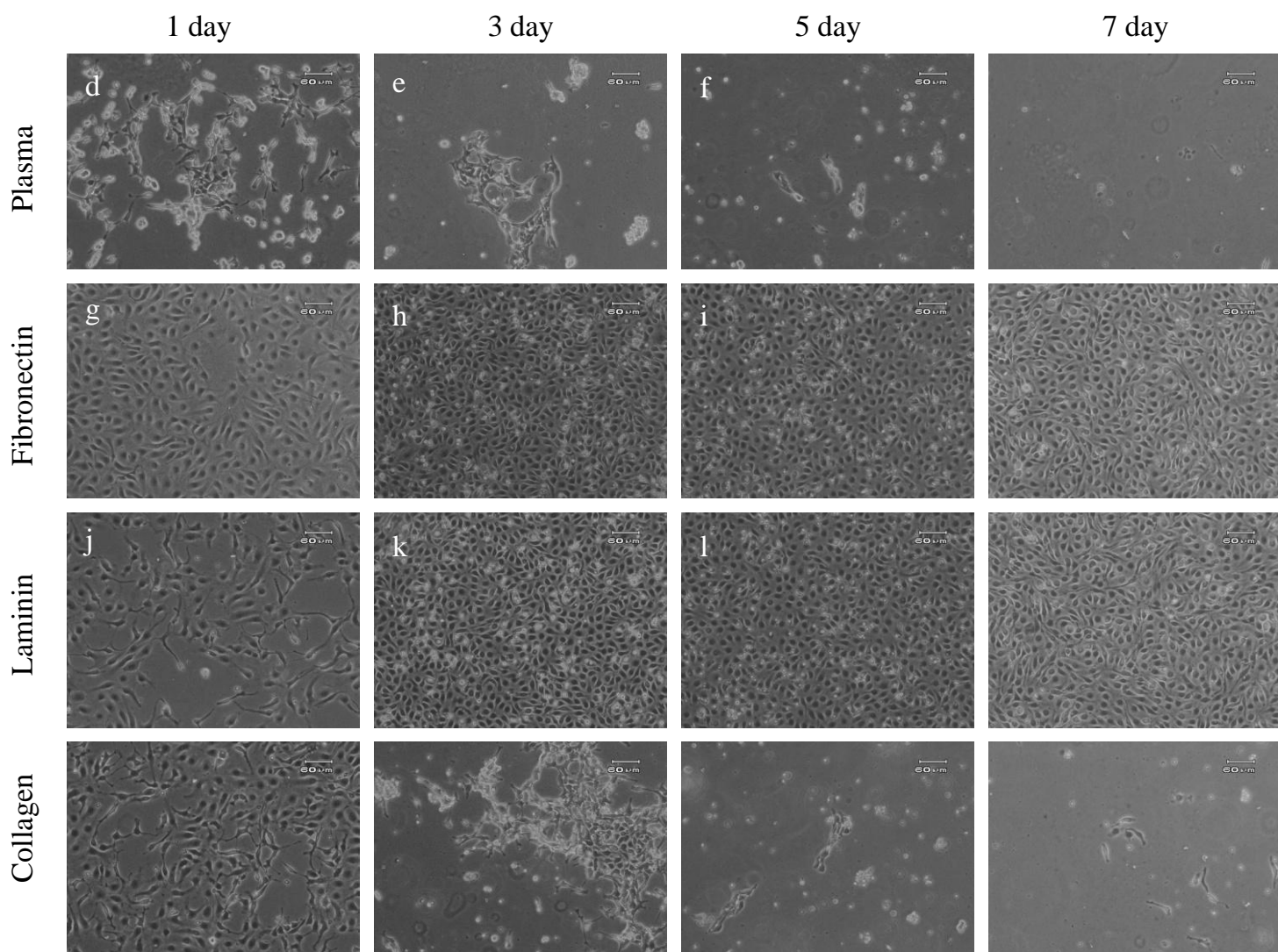


Fig. 11 Chronological observation of RAOEC. (a~c) Representative images of the RAOEC on the surface of polystyrene. (d~l) Representative images of the RAOEC on the surface of the PTFE-coated glass treated with plasma or each protein.