

氏名(本籍)	犬飼直人(神奈川県)
学位の種類	博士(学術)
学位記番号	甲第66号
学位授与年月日	平成28年9月30日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 滝沢達也 (副査) 浅井史敏 折戸謙介 田中和明

論文内容の要旨

【緒論】

Polytetrafluoroethylene (PTFE) 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、血小板付着抑制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、血管内皮細胞の接着の安定性が重要である。その評価には、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適している。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光透過率が不十分であり位相差顕微鏡による観察ができない。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、機械的強度が不十分となり、実験に用いるのは困難である。このため、PTFE 表面の細胞の経日的観察の報告、特に血液との接触を想定した基礎的な報告はほとんどない。

本研究は2章から構成されている。第1章では培養下において PTFE 表面の細胞の位相差観察を可能にするため、後述の PTFE コートガラスを開発し、PTFE 表面の細胞を可視化できることを示した。第2章では、開発した PTFE コートガラスを用いて、血液との接触を想定して内皮細胞を経日的に観察し、血中分子と細胞外マトリクスを介した接着を評価した。

第1章：PTFE 表面の細胞の可視化

【背景と目的】

PTFE 表面には細胞が直接接着することがほとんどないものの、血漿を介することで接着が可能になることが報告されている。PTFE は光透過率が低いいため、位相差顕微鏡による生細胞の観察ができず、固定、染色した後に観察が行われている。

本章では、カバーガラス上に薄膜の PTFE コーティングを施した PTFE コートガラスを開発することで、PTFE 表面の生細胞の位相差顕微鏡観察を可能にすることを目的とした。

【材料と方法】

PTFE コートガラスと一般的な PTFE 樹脂 (PTFE ブロック) で細胞接着の低さの同等性を評価するために、ラット大動脈血管内皮細胞 (RAOEC) を播種し、24 時間後の接着細胞数を WST-8 Assay で測定した。

血漿を介した細胞接着も PTFE コートガラスと PTFE ブロックで同等であるか評価するために、PTFE コートガラスと PTFE ブロックをラット血漿に一昼夜浸漬した後、ラット大動脈血管内皮細胞 (RAOEC) を播種し、24 時間後の接着細胞数を WST-8 Assay で測定した。血漿を介して PTFE 表面に接着した細胞の観察には、倒立型位相差顕微鏡を用いた。

【結果と考察】

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。また、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 が接着可能になった。この接着した細胞は PTFE コートガラスにおいてのみ位相差観察が可能であった。また、PTFE コートガラス表面には、実験中に大きな傷や剥離は確認されなかった。これらのことから、PTFE コートガラスは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。

【結論】

これまで PTFE 表面の細胞を観察するためには、固定や染色が必要であったが、PTFE コートガラスを用いることで PTFE 表面の位相差顕微鏡による培養下での生細胞観察が可能になった。

第 2 章：血中分子と細胞外マトリクスを介した PTFE への細胞接着の評価

2-1：PTFE への細胞接着の短期的解析

【背景と目的】

安定した細胞の接着の指標の一つとして、細胞が仮足を広げているかどうかを挙げられる。しかし、PTFE 表面は位相差顕微鏡観察が困難であるため、接着細胞の形態評価はほとんど行われていない。PTFE コートガラスを用いることで、細胞仮足の位相差観察が容易に行え、細胞接着の安定性を評価することが可能である。

そこで、第 1 章で示した血漿を介した細胞接着が接着分子特異的か、また、どの接着分子が PTFE 表面への細胞接着を促進するか解析した。同時に、これらの接着分子が PTFE 表面への血小板接着に及ぼす影響を解析することで、血小板接着を促進せずに内皮化を促進する物質を探索することを目的とした。

【材料と方法】

血漿を介した細胞接着が接着分子特異的か解析するために、血漿処理 PTFE コートガラスに、広範囲な接着分子阻害ペプチドであるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン (RGDS) で処理した RAOEC を播種し、24 時間後に位相差顕微鏡観察および WST-8 Assay で細胞接着を解析した。

接着分子であるフィブロネクチン、ヴィトロネクチン、フィブリノゲン、ラミニン、コラーゲンの細胞接着への影響を評価するために、PTFE コートガラスをこれらの接着分子で前章と同様に処理し、RAOEC を播種し、24 時間後の接着を位相差顕微鏡観察および WST-8 Assay で評価した。また、同様にラット血小板を播種し 90 分後の接着を乳酸脱水素酵素 (LDH) Assay で評価した。

フィブリノゲンの細胞接着への影響を解析するために、PTFE コートガラスを前章と同様に血漿もしくは血清で処理し、RAOEC を播種し、24 時間後の接着を位相差顕微鏡観察および WST-8 Assay で評価した。また、ラット血小板を播種し、90 分後の接着を乳酸脱水素酵素 (LDH) Assay で評価した。

【結果と考察】

血漿処理 PTFE コートガラス表面の、RGDS 処理された RAOEC を位相差顕微鏡観察した結果、仮足を広げない不安定な接着が確認された。この細胞接着を WST-8 Assay で評価すると、RGDS により抑制される傾向が示された。

接着分子で処理した PTFE コートガラス表面の RAOEC を位相差顕微鏡観察した結果、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン処理において RAOEC の仮足を広げた安定な接着が確認された。このときの細胞接着を WST-8 Assay で評価すると、フィブロネクチン処理が最も高い細胞接着を示し、次いでラミニンとコラーゲン処理が比較的高い細胞接着を示した。また、血小板の接着ではフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン処理が抑制傾向を示し、フィブリノゲン処理は促進傾向を示した。

【結論】

PTFE への血漿を介した RAOEC の接着は接着分子特異的であることが示唆され、接着分子のうちフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンが PTFE への細胞接着を誘導することが示された。

2-2 : PTFE への細胞接着の経日的解析

【背景と目的】

2-1 より血漿、フィブロネクチン、ラミニンもしくはコラーゲン処理された PTFE 表面において、播種 24 時間後では仮足を広げた細胞接着が確認された。人工血管の内皮化には、これらの接着がより長期間にわたり安定であり、その表面で細胞増殖が可能であることが重要である。

このため、これらの処理をされた PTFE 表面の細胞接着の安定性および増殖を経日的に評価することで、人工血管の内皮化に有用な分子を探索することを目的とした。

【材料と方法】

血漿、フィブロネクチン、ラミニンもしくはコラーゲンで前章と同様に PTFE コートガラスを処理

し、RAOEC を播種し、経日的に位相差顕微鏡により観察し、細胞接着の安定性および増殖を評価した。

【結果と考察】

フィブロネクチンおよびラミニン処理した PTFE 表面への RAOEC の接着は安定的であり、細胞増殖もみられ、PTFE 表面の内皮化が可能であった。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、この接着は不安定であり、播種 7 日以内にほとんどの内皮細胞が剥離し、内皮化は起こらなかった。フィブロネクチンやラミニンが、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たことから、これらの処理を PTFE 製人工血管にも施すことで、安定な内皮化を引き起こすことが可能になると予測された。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接着細胞が認められなくなった。移植された PTFE 製人工血管においても、血液を介した細胞接着は不安定であり、内皮化が起こりにくいと予測された。

【結論】

本実験で PTFE 表面へのフィブロネクチンやラミニン処理が、安定な細胞接着を引き起こし、内皮化を可能にすることが示された。また、血漿で処理された PTFE 表面は細胞接着が不安定であり、内皮化が困難であることが示唆された。

【総括】

本研究では、カバーガラスに 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（第 1 章）。位相差顕微鏡を用いて、PTFE コートガラス表面の RAOEC を経日的に観察した。血漿処理された PTFE 表面では、播種 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、不安定であるため内皮化の速度が遅くなると予測された（第 2 章）。

研究により PTFE 表面の細胞観察が容易となったため、細胞の接着安定性等を評価することで、人工血管をはじめとする PTFE 製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。

N. Inukai, K. Tanaka, T. Takizawa: A convenient technique for live-cell observation on the surface of polytetrafluoroethylene with a phase-contrast microscope. *Microscopy*, 2016,1-7.

論文審査の結果の要旨

Polytetrafluoroethylene (PTFE) はフッ素樹脂の一種であり、生体適合性と化学的安定性が高く、細胞が接着しにくいことから、人工血管等の医療機器に広く使用されている。PTFE 製の人工血管で

は、血栓形成の抑制のために、血小板の粘着抑制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 製人工血管が長期間の抗血栓性を維持するためには、血管内皮細胞の安定した接着が重要である。この評価には、経日的な観察が必要であり、位相差顕微鏡による観察が適している。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、十分な強度では光透過率が不十分であり、位相差顕微鏡による観察ができない。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、機械的強度が不十分となり、研究に用いるのは困難である。このため、PTFE 表面の細胞の経日的観察、特に血中分子との接触を想定した基礎的な報告は見当たらない。

本研究では、これらの課題を解決するために、まず、PTFE 表面の細胞を可視化できるような PTFE コートガラスを開発し、次に、開発した PTFE コートガラス上の内皮細胞を経日的に観察し、血中分子と細胞外マトリクスを介した接着を評価している。

本研究は 2 章からなり、第 1 章で PTFE コートガラスを開発し、表面上の性質が PTFE 樹脂（PTFE ブロック）と同等であることを示し、第 2 章では、開発した PTFE コートガラス表面上での血中分子と細胞外マトリクスを介した細胞の接着と増殖を評価している。

第 1 章 PTFE 表面の細胞の可視化

カバーガラス上に薄膜の PTFE コーティングを施した PTFE コートガラスを開発することで、PTFE 表面上の生細胞の位相差顕微鏡観察が可能になるか検討している。次いで開発した PTFE コートガラスと一般的な PTFE ブロックでは、同じように細胞が接着しにくいのか、また、血漿処理した場合にも同様に細胞が接着できるか、ラット大動脈血管内皮細胞を播種後に観察し、接着細胞数を WST-8 Assay で評価している。その結果、PTFE コートガラスには PTFE ブロックと同様に内皮細胞はほとんど接着しないが、血漿処理により内皮細胞の接着が可能になることが示された。また、接着細胞は PTFE コートガラスにおいてのみ位相差顕微鏡による観察が可能であった。なお、PTFE コートガラス表面には、実験中に大きな傷や剥離は確認されなかった。

これらの結果から、開発した PTFE コートガラスは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、これまで必要であった固定や染色をせずに、PTFE 表面上の生細胞を位相差顕微鏡で観察することが可能になった。

第 2 章 血中分子と細胞外マトリクスを介した PTFE への細胞接着の評価

2-1 PTFE への細胞接着の短期的解析

開発した PTFE コートガラスを用いて、まず、血漿を介した細胞接着の接着分子特異性を検討している。血漿処理した PTFE コートガラス表面上に、広範囲な接着分子の阻害ペプチドであるアルギニン-グリシン-アスパラギン酸-セリン（RGDS）で処理した内皮細胞を播種すると、位相差顕微鏡観察により細胞は仮足を広げない不安定な接着状態を示し、WST-8 Assay では細胞接着の抑制傾向が示された。

次に、PTFE 表面への血小板粘着を促進せずに内皮化を促進する因子を探索している。フィブロネ

クチン、ラミニン、コラーゲン処理では内皮細胞の安定な接着が確認され、WST-8 Assay ではフィブロネクチン処理が最も高い細胞接着を示し、次いでラミニンとコラーゲン処理が比較的高い細胞接着を示した。また、血小板粘着では乳酸脱水素酵素 (LDH) Assay により、フィブロネクチン、ラミニン、コラーゲン処理は抑制傾向を示し、フィブリノゲン処理は促進傾向を示した。

これらの結果から、PTFE への血漿を介した内皮細胞の接着は接着分子特異的であることが示唆され、接着分子のうちフィブロネクチン、ラミニン、コラーゲンが PTFE への内皮細胞の接着を促進することが示された。

2-2 PTFE への細胞接着の経日的解析

これまでの結果から、血漿、フィブロネクチン、ラミニンあるいはコラーゲン処理された PTFE 表面では、播種 1 日後では安定した内皮細胞の接着が確認された。人工血管の内皮化には、これらの接着が長期間安定であり、その表面で細胞増殖が可能であることが重要である。このため、血漿、フィブロネクチン、ラミニンもしくはコラーゲンで PTFE コートガラスを処理し、内皮細胞播種後、接着の安定性および細胞増殖を位相差顕微鏡により経日的に観察した。その結果、血漿とコラーゲンは PTFE 表面への細胞接着を促進したが、接着は不安定であり、播種 7 日以内にほとんどの内皮細胞が剥離した。一方、フィブロネクチンやラミニンで処理した PTFE 表面への内皮細胞の接着は安定であり、細胞増殖も観察された。これらの結果から、血漿処理後の PTFE 表面では内皮細胞が接着するが、不安定であることから、移植された PTFE 製人工血管においても、血液を介した細胞接着は不安定であり、内皮化が起りにくいと予測された。一方、フィブロネクチンやラミニンが、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から、PTFE 製人工血管においても、これらの処理を施すことで、安定的な内皮化が可能になると予測された。

PTFE は細胞が接着しにくいことから、人工血管などに使用されているが、血栓形成の抑制のためには血小板の粘着抑制や内皮細胞による内皮化の研究が重要である。しかし、PTFE は光透過率が低く、継続的な細胞観察が困難であった。本研究では、PTFE コートガラスを開発することで、PTFE 表面上の位相差顕微鏡観察を可能にした。開発した PTFE コートガラス表面上の内皮細胞を経日的に観察することで、血漿処理された PTFE 表面では、播種 7 日後にはほとんどの内皮細胞が剥離するが、フィブロネクチンやラミニンで処理された PTFE 表面上の細胞接着は安定であり、細胞増殖を促進することが示された。

以上のように、本研究は人工血管などの改良に繋がる PTFE 表面上の細胞の接着と増殖を評価する上で貴重な新知見を得ており、博士 (学術) の学位を授与するに値する業績と判定した。