

3章 F-DLC 膜の生体適合性の評価

3-1 緒言

ステントは虚血性心疾患の治療に用いられる。ステントを留置すると、ステントを留置した際に生じた血管壁の障害やステントという異物に対して生体反応が起こる。血小板が接着・蓄積することで血栓を形成するステント血栓症が発生したり、炎症が慢性化し細胞が過増殖して再び血管内が狭くなったり詰まったりしてしまうステント内再狭窄が引き起こされる。このステント血栓症やステント内再狭窄をいかに抑えるかがステント治療において重要になる。

ステントが留置されると、血管壁が障害され、血小板や白血球がステントを異物として認識することで、血栓形成や炎症反応が起こる。障害部位が治癒しステントが細胞で被覆されると、血液にステントが晒されなくなり異物反応や炎症反応が終息する。つまり、理想的なステントは、血栓形成を防ぐだけでなく、炎症を抑制し細胞の過増殖を防ぐが、血管内皮細胞の再生によりステントが被覆される必要がある。

ステントなどのバイオマテリアルの生体適合性を向上させるにはいくつか方法があるが、コーティングをすることでバイオマテリアル表面の性質を変えることは有用な手段である。DLC にフッ素を添加することで血小板の接着を抑制し、抗血栓性が向上することがわかっており(19)、血液に接触するステントのようなバイオマテリアルに F-DLC 膜をコーティングすることで抗血栓性を付与できると期待できる。

F-DLC 膜は抗血栓性以外にも内皮細胞増殖を阻害することなく、血漿タンパク質の吸着を減少させることがわかっているが(20, 21)、F-DLC 膜がステント再狭窄の重要なファクターである炎症に及ぼす影響については未だ明らかになっていない。

本研究では、F-DLC コーティングのステントへの応用を目的とし、そのために F-DLC 膜の生体適合性の評価を行う。F-DLC 膜の抗血栓性については研究されているが、抗炎症性や細胞接着性など多角的に評価した研究は未だない。そこで、本研究では F-DLC 膜の生体適合性を様々な細胞を用いて評価することを試みた。抗血栓性を評価するために血栓形成に関わる血小板を用いて、血小板の接着および血小板表面抗原 CD62P の活性化を評価した。また、抗炎症性を評価するために炎症の重要なファクターである白血球を用いて、白血球の接着および白血球から産生されるサイトカインを測定した。ステントに対する異物反応が終息するためには、ステントが血管内皮細胞に被覆される必要があるため、F-DLC 膜上での内皮細胞の接着・増殖を確認し、産生されるサイトカインも測定した。

3-2 F-DLC 膜に対する細胞接着実験

3-2-1 サンプルの下処理

F-DLC コーティングした SUS disc (F-DLC-coated SUS disc) と F-DLC コーティングしていない SUS disc (F-DLC-uncoated SUS disc) を用意した。φ10 cm シャーレに各 disc を入れ、99.5% Ethanol を加えて攪拌し Ethanol を吸引除去した。これを 3 回繰り返して disc を消毒した後、PBS(-)または生理食塩水を加えて攪拌し吸引除去した。これを 3 回繰り返して disc を洗浄した。消毒・洗浄した F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc を 0.1% BSA/RPMI-1640 溶液に浸し、1 時間以上インキュベートした。24-well plate の各 well にも 2 ml 0.1% BSA/RPMI-1640 溶液を加え、同様にインキュベートした。24-wel plate の well に各 disc を入れ、実験直前に 0.1% BSA/RPMI-1640 溶液を除去し、実験サンプルとした。

3-2-2 血球細胞の分離

[血小板の分離]

10 日以上服薬していない健康なボランティアよりヒト全血を採血した。採血の際には血小板が活性化しないよう針は 21G とし、ゆっくりと採血した。採血したヒト全血に ACD 液 (acid-citrate-dextrose) をヒト全血 : ACD 液 = 7 : 1 の割合で加え、抗凝固処理を施した。350 g で室温にて 10 分間遠心し、上層より多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) を得た。残りの血液を 1,500 g で 4 °C にて 15 分間遠心し、上層より少血小板血漿 (platelet-poor plasma: PPP) を得た。PRP を PPP で希釈し、 3.0×10^5 cells/ μ l とした。調整した PRP を室温で 30 分静置することで、活性化した血小板を休めた。

なお、本研究に関しては倫理委員会にて承認を得ており、全てのドナーから了承を得ている。

[白血球の分離]

白血球は Mono-Poly Resolving Medium (DS PHARMA BIOMEDICAL) を用いて 1step で分離した。10 日以上服薬していない健康なボランティアより 21G の針でヒト全血を採血した。採血した血液に Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を全血 1 ml に対して

約 1 g 加えて抗凝固処理を行った。抗凝固処理した全血 24 ml を 21 ml の Mono-poly Resolving Medium に静かに重層し、室温にて 400 g で 25 分間遠心した。遠心後、血液は下から赤血球層、好中球層、リンパ球・単球層、血漿層に分かれた。白血球は好中球層とリンパ球・単球層の二層に分かれた。血漿層を取り除き、2 層の白血球層を 25 ml tube に移した。集めた白血球に PBS(-)を加えて室温にて 250 g で 10 分間遠心して上清を除去した。得られた白血球を 0.1% BSA/RPMI-1640 溶液で再浮遊し、 3.0×10^6 cells/ml に調整した。

好中球も白血球と同様に Mono-Poly Resolving Medium を用いて分離した。遠心後血漿層を除去し、リンパ球・単球層が混ざらないように注意しながら、好中球層のみを 25 ml tube に移した。集めた好中球に PBS(-)を加えて室温にて 250 g で 10 分間遠心して上清を除去した。分離した好中球を 0.1% BSA/RPMI-1640 溶液で再浮遊し、 3.0×10^6 cells/ml に調整した。

3-2-3 HUVEC の培養

F-DLC-coated SUS disc への血管内皮細胞の接着能を評価するために、臍帯より分離したヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVEC) を用いた培養実験を行った。培養には 5% fetal bovine serum (CCT) と 1% antibiotic-antimycotic (Gibco)、5 μ g/ml heparin-sodium salt (sigma)、20 ng/ml human bFGF (invitrogen)、5 ng/ml human VEGF (vascular endothelial growth factor, peprotech) を添加した human

endothelial serum free medium (Gibco) を使用した。6-well plate はあらかじめ 0.1% Gelatin-PBS でコーティングした。細胞は 5% CO₂ インキュベーター内にて 37℃ で培養し、sub-confluent になったら継代を行なった。

3-2-4 F-DLC 膜に対する細胞接着実験

[血球細胞接着実験]

実験サンプルの F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc を入れた well に 3.0×10^5 cells/ml に調整した PRP もしくは 3.0×10^6 cells/ml に調整した好中球浮遊液を 1 ml ずつ播種した。生体内では血流があり、血流により生じるすり応力が血球に影響を与えることが知られているため(40-42)、細胞を播種した 24-well plate を 37℃ で 60 分間、60 rpm の速度でシェアリングし、血球細胞を接着させた。

その後、上清を取り除き、静かに PBS(-)を加えて吸引除去し、disc を洗浄した。1% glutaraldehyde を 800 μ l 加え、室温にて 1 時間、もしくは 4℃ にて overnight で静置し、disc に接着した血球細胞を固定した。固定後、disc を well から取り出してシャーレに移し、生理食塩水で 2 回洗浄後、milliQ 水で 2 回洗浄した。エタノールで段階的に脱水し (20%、40%、60%、80%、90%、95%、99.5%、99.5%、それぞれ 15 分間ずつ)、disc 表面に残ったエタノールを disc の隅からキムワイプで慎重に吸い取った後、室温にて自然乾燥した。

実験は血液 1 検体につき F-DLC-coated SUS disc、F-DLC-uncoated SUS disc それぞれ 3disc ずつ行った。血液の検体数は血小板では 3 検体、好中球では 1 検体行った。接着数は 1 つの disc につき同心円状に中心を含む 17 箇所を選び顕微鏡 (DIGITAL MICROSCOPE VHX-900、KEYENCE) で撮影した (Fig. 11)。一つの観察箇所の面積は $600\ \mu\text{m} \times 440\ \mu\text{m}$ とした。撮影した写真より接着した血球細胞数を数えた。接着した白血球には分離時に混入したリンパ球や単球もわずかに観察できたが、ほとんどが好中球であり、好中球の数を数えた。

結果は各箇所で観察された接着血球数の平均値と SD で表した。Mann-Whitney's U test で比較し、 $P < 0.05$ で有意差が認められるとした。

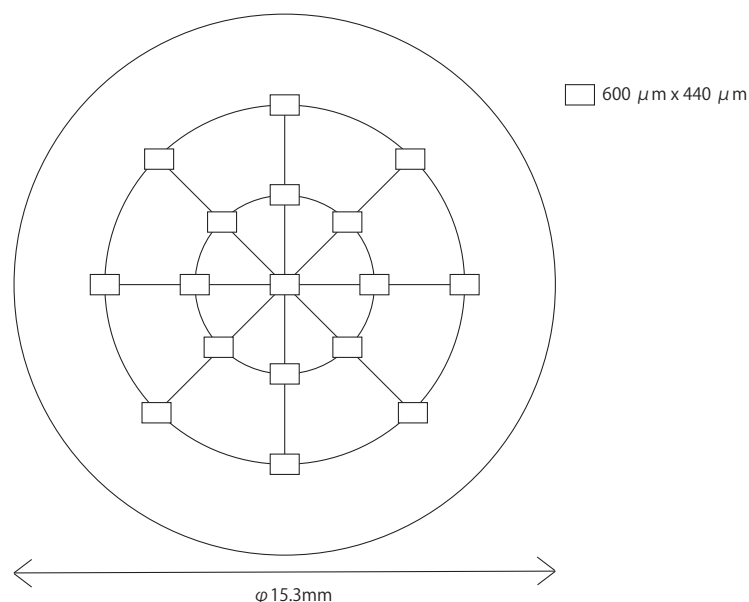


Fig. 11 The observation points of platelets or neutrophils for counting. Measurement was made at 17 points concentrically.

[F-DLC 膜への HUVEC の接着・培養実験]

24-well plate はあらかじめ 0.1% Gelatin-PBS でコーティングした。実験サンプルの F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc を 24-well plate の well に入れ、 5×10^4 cells/well の細胞数で HUVEC を播種し、5% CO₂ インキュベーター内にて 37°C で培養した。3 時間培養したのち、接着していない HUVEC を取り除き、新しい培地と交換した。そのまま 5% CO₂ インキュベーター内にて 37°C で培養した。培養期間は 1、2、3、4 週間とした。培地は 2~3 日置きに交換した。培養後、培地を取り除き、disc を PBS(-) で静かに洗浄した。4% paraformaldehyde (PFA) を 1 ml 加えて室温にて 1 時間、もしくは 4°C overnight で静置し、disc に接着した HUVEC を固定した。固定後、disc を well から取り出してシャーレに移し、生理食塩水で 2 回洗浄後、milliQ 水で 2 回洗浄した。段階的にエタノールで脱水し (20%、40%、60%、80%、90%、95%、99.5%、99.5%、それぞれ 15 分間ずつ)、disc 表面に残ったエタノールを disc の隅からキムワイプで慎重に吸い取った後、室温にて自然乾燥した。

実験は F-DLC-coated SUS disc、F-DLC-uncoated SUS disc それぞれ 3 disc ずつ行った。接着数は 1 つの disc につき 16 箇所を選び、顕微鏡 (DIGITAL MICROSCOPE VHX-900、KEYENCE) で撮影した。撮影した写真より接着した HUVEC の接着数を数えた。一つの観察箇所の面積は 1mm^2 であった。

結果は各箇所で観察された接着数の平均値と SD で表し、Mann-Whitney's U test で比較し、 $P < 0.05$ で有意差が認められるとした。

3-2-5 血小板の表面抗原 CD62P の測定

実験サンプルの F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc を入れた well に 3.0×10^5 cells/ml に調整した PRP を 1 ml ずつ播種した。24-well plate を 37°C で 60 分間、60 rpm の速度でシェアリングし、血小板を接着させた。実験サンプルに接触した血小板の表面抗原 CD62P を測定するために上清を回収した。接着した血小板を剥がすと活性化したり、血小板の接着が強いため剥がしきれなかったりするため、Park らの手法を参考にし、上清を使用して測定した(43, 44)。回収した上清に終濃度が 1~2% になるようにすぐに 4% PFA を加え、15 分間室温にて上清中の血小板を固定した。固定後、1000 g で 5 分間遠心し、上清を除去して固定液を取り除いた。固定した血小板に PBS(-)を加え、600 g で 5 分間遠心して上清を除去し、血小板を洗浄した。これを 2 回繰り返した。洗浄後、0.1% BSA 0.01% sodium azide (NaN₃)/PBS(-)溶液に浮遊させた。細胞数をカウントし、 $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml に調整し、100 μ l ずつ FACS tube に分注した。蛍光標識された CD62P のモノクローナル抗体を加え、30 分間 4°C で遮光してインキュベートした。蛍光標識されたサンプルは PBS(-)で 2 回洗浄後、300 μ l BSA-NaN₃-PBS に浮遊させ、flow-cytometer (FACS Canto Flow Cytometer、BD) で測定した。negative control として、isotype-matched mouse IgG を用いた。血液は 8 検体準備し、血液 1 検体につき F-DLC-coated SUS disc、F-DLC-uncoated SUS disc それぞれ 3 disc ずつ行った。得られたデータは Flowjo (トミーデジタルバイオロジー) で解析した。

結果は Wilcoxon signed-rank test で比較し、 $P < 0.05$ で有意差が認められるとした。

3-2-6 サイトカインの測定

実験サンプルの F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc を入れた well に 3.0×10^6 cells/ml に調整した白血球浮遊液を 1 ml ずつ播種した。24-well plate を 37°C で 60 分間、60 rpm の速度でシェアリングし、白血球を接着させた。また、 5×10^4 cells/well の細胞数で HUVEC を播種し、5% CO_2 インキュベーター内にて 37°C で 3 時間培養した。その後、上清を回収し、1000 g で 10 分間遠心して細胞を取り除いた。回収した上清は -80°C で保存した。白血球では血液 7 検体を用いて行い、HUVEC では F-DLC-uncoated SUS disc、F-DLC-coated SUS disc それぞれ 3 disc ずつ行った。上清中のサイトカインは Luminex システム (Luminex) を使って測定した。Human Cytokine Group I 27-Plex (Bio-Rad) と Human Cytokine Group II (Bio-Rad) を用いて測定した (Table 5)。測定結果は Luminex システムのソフトウェアで分析した。

Table 5 Measurement items of cytokines produced from white blood cells and HUVECs exposed to F-DLC-coated SUS disc and F-DLC-uncoated SUS disc.

Group I		Group II	
IL-1 β	Eotaxin	IL-1 α	MCP-3
IL-1ra	FGF-basic	IL-2R α	M-CSF
IL-2	G-CSF	IL-3	MIF
IL-4	GM-SCF	IL-12(p40)	MIG
IL-5	IFN- γ	IL-16	NGF- β
IL-6	IP-10	IL-18	SCF
IL-7	MCP-1	CTACK	SCGF- β
IL-8	MIP-1 α	GRO- α	SDF-1 α
IL-9	MIP- β	HGF	TNF- β
IL-10	PDGF-BB	IFN- α 2	TRAIL
IL-12(p70)	RANTES	LIF	
IL-13	TNF- α		
IL-15	VEGF		
IL-17			

3-3 結果と考察

3-3-1 血小板に対する F-DLC 膜の評価実験結果

[血小板接着数]

A、B、C のどの血液検体においても F-DLC-coated SUS disc は F-DLC-uncoated SUS disc に比べて接着した血小板が少なかった。血小板接着数の平均値は F-DLC-coated SUS disc では 97.6 ± 69.2 cells/area であり、F-DLC-uncoated SUS disc では 147.1 ± 84.3 cells/area であった。F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc を比較すると、F-DLC-coated SUS disc の方が接着数は少なく、有意差が認められた (Mann-Whitney's U-test、 $p < 0.001$ 、Fig. 12)。

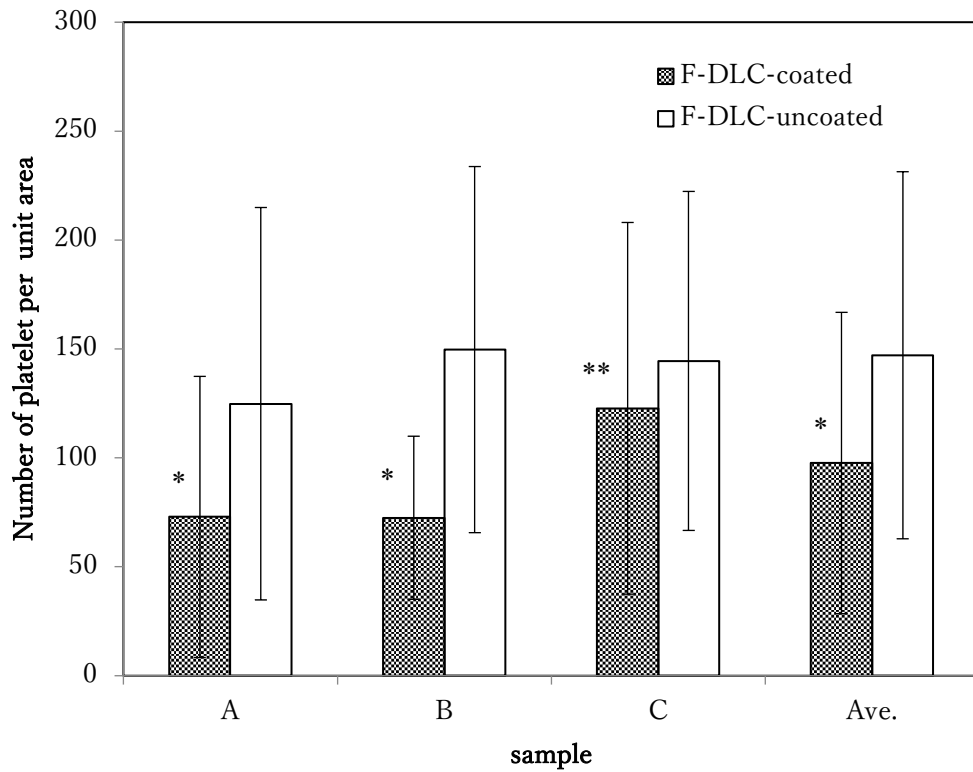


Fig. 12 The number of platelet adherent to F-DLC-coated and F-DLC-uncoated SUS discs (N=3). Results are the mean \pm SD. Compared to F-DLC-uncoated SUS discs, a significantly lower number of platelets adhered to F-DLC-coated ones in all 3 experimental settings (Mann-Whitney's U test, A and B: $p < 0.001$, C: $p < 0.025$, Ave: $p < 0.001$). Also, significance was observed in the mean of the 3 settings.

[血小板表面抗原 CD62P の発現]

血小板の表面抗原である CD62P の発現を Flow-cytometer を使って評価した。F-DLC-coated SUS disc に接触した血小板と F-DLC-uncoated SUS disc に接触した血小板の CD62P の発現を Fig. 13 に示す。F-DLC-uncoated SUS disc の方が蛍光強度の強い細胞が多く存在しており、より CD62P を発現していることがわかる。F-DLC-coated SUS disc に接触した血小板に比べ、F-DLC-uncoated SUS disc に接触した血小板の方がすべての検体で CD62P の発現が高かった。

CD62P のヒストグラムよりネガティブコントロールよりも蛍光強度が強い細胞を陽性細胞とみなし、CD62P 陽性細胞の割合を算出した (Fig.14)。CD62P 陽性細胞の割合を Fig. 15 に示す。すべての検体において F-DLC-coated SUS disc に接触した血小板よりも F-DLC-uncoated SUS disc に接触した血小板の方が CD62P 陽性細胞の割合は高かった。F-DLC-coated SUS disc の方が F-DLC-uncoated SUS disc に比べて CD62P 陽性細胞が少なく、有意差が認められた (Wilcoxon signed-rank test、 $p<0.01$)。

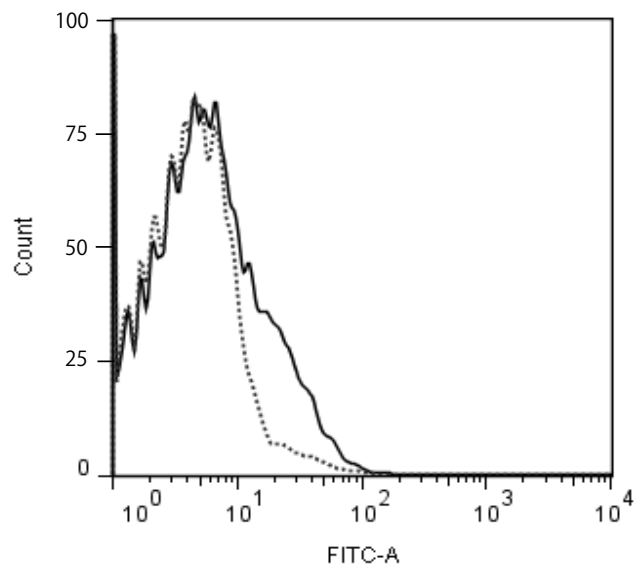


Fig. 13 Histogram plot of CD62P expression on platelets analyzed by flow-cytometry. The solid line represents the expression of CD62P on platelets exposed to F-DLC-uncoated SUS disc and the dotted line, that of platelets exposed to F-DLC-coated one. In all cases, the expression of CD62P was higher on platelets exposed to F-DLC-uncoated SUS discs compared to those exposed to F-DLC-coated ones. FITC-A: fluorescein isothiocyanate-area

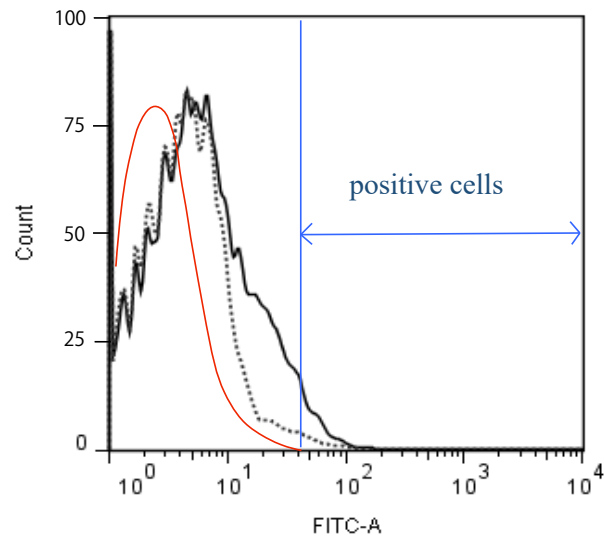


Fig.14 Calculation method of the percentage of CD62P positive cells. Red line: simplified schematic of negative control. The percentage of CD62P positive cells was calculation from the positive cells that is out of negative control. FITC-A: fluorescein isothiocyanate-area.

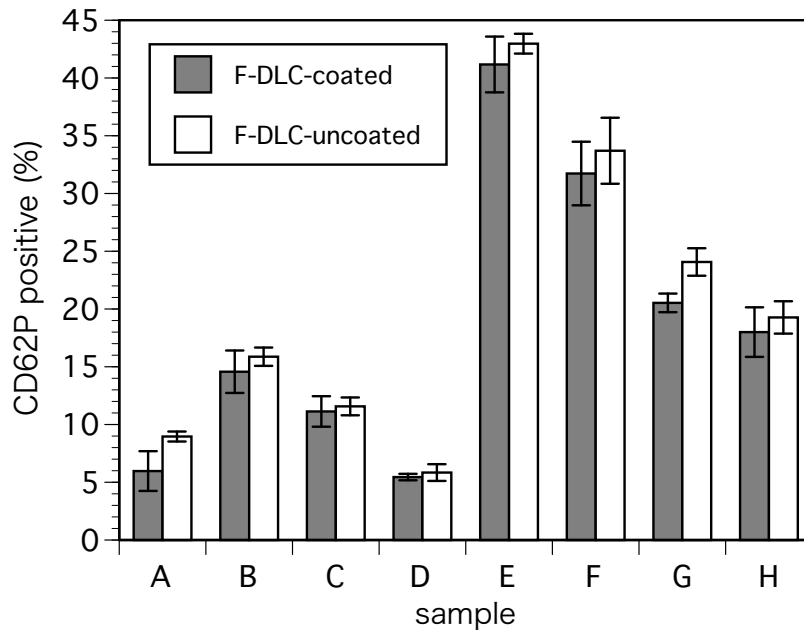


Fig. 15 The percentage of CD62P positive cells on the surface of platelets analyzed by flow-cytometry (N=8). Results are the mean \pm SD. The CD62P positive cells on platelets exposed to F-DLC-coated SUS disc was reduced compared to those exposed to F-DLC-uncoated SUS disc in all 8 samples. The CD62P positive cells on platelets exposed to F-DLC-coated SUS disc was significantly reduced compared to those exposed to F-DLC-uncoated one (18.6 ± 11.7 vs. 20.3 ± 12.0) (Wilcoxon signed-rank test: $p < 0.01$).

[考察]

血管内皮が損傷すると、損傷部位に露出したコラーゲンなどの皮下組織に血漿中に存在する von Willebrand factor (vWF) が結合する。そこに血小板の GP I b がゆるく結合し、rolling しながら活性化していく。活性化した血小板表面には GP II b/III a が発現し、vWF やフィブリノゲンと強固な結合を作り、次々とつながりながら血小板が凝集し血栓を形成していく。つまり、血小板の接着が始まると、血栓が形成されていくことになる。F-DLC-coated SUS disc では血小板の接着を抑制していることがわかった。よって、F-DLC 膜は血栓形成を抑える働きがあることが示唆された。なお、血小板接着数の SD が大きいのが、これは血小板が接着し始めると活性化した血小板表面に次々と血小板が接着・凝集していくことで局所的に接着数が多くなったと考えられる。また、シェアリングすることで中心に血小板が集まりやすくなり、血小板の濃度差ができてしまうことも原因の一つであろう。

材料表面の特性を表す指標の一つとして接触角がある。表面自由エネルギーが小さいと接触角は大きくなり、疎水性となる。DLC に添加するフッ素量を多くするほど表面自由エネルギーが小さくなり、より疎水性になることが知られている(35)。全血との接触角も大きくなり、血小板の接着数が減少することが報告されている(19)。

SUS316L、DLC、F-DLC 膜の接触角はそれぞれ $62.2 \pm 3.9^\circ$ 、 $92.8 \pm 4.6^\circ$ 、 $105.2 \pm 2.5^\circ$ であり、F-DLC 膜は疎水性を持つことがわかっている(22)。本研究で用いた F-DLC 膜と成膜方法は異なるが、本研究で用いた F-DLC 膜も表面自由エネルギーが低く、疎水性であることが予想される。これにより血小板の接着を抑制していると考えられる。

また、DLC にフッ素を添加することでアルブミンとフィブリノゲンの吸着を抑制し、かつアルブミン/フィブリノゲン比が大きくなり、血小板の接着を抑制したとの報告もある(20)。一般にバイオマテリアルが血管内に留置されると、まず血漿タンパクが吸着すると言われている。血漿タンパクは主にアルブミン、フィブリノゲン、 γ グロブリンがある。このうち、フィブリノゲンは血小板の接着を亢進する。フッ素を含むポリイミドは、物質全体では疎水性を示すが表面ではフッ素があるため負電荷で覆われており、生理的条件下において負に帯電しているアルブミンとフィブリノゲンの吸着を抑制するとの報告がある(45, 46)。F-DLC 膜においても同様に電気陰性度の高いフッ素が表面にあることで部分的に負に帯電していると考えられ、血漿中のフィブリノゲンの吸着を抑制することで血小板の接着を抑制していると考えられる。

血漿タンパクの吸着では、表面に到達しやすいタンパク質が最初に吸着し、その後アフィニティーの高い他のタンパク質に置き換わる (Vroman 効果) (47-49)。また、アルブミンは疎水性表面においてアルブミンが持つ疎水性アミノ酸残基と疎水性表面との疎水性相互作用により強く吸着し、アルブミン吸着後に親水性表面では γ グロブリンやフィブリノゲンと置き換わるが、疎水性表面では置きかわりが起きづらい(50)。F-DLC 膜は疎水性を呈しており、アルブミン吸着後の置き換わりが起きづらく、フィブリノゲンが吸着しにくいと考えられる。アルブミンの吸着が多いと血小板は接着しにくくなり(51)、フィブリノゲンの吸着が多いと血小板の接着が促進される。フィブリノゲンへの置きかわりが起きにくいことも血小板の接着抑制に働いたのかもしれない。

F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc に接触した血小板の CD62P の発現を調べたところ、F-DLC-coated SUS disc では F-DLC-uncoated SUS disc に比べて CD62P の発現が抑制されていた。

CD62P (P-セレクチン) はセレクチンファミリーに属する細胞接着分子である。セレクチンには E-セレクチン、P-セレクチン、L-セレクチンがある。それぞれ血管内皮細胞、血小板、白血球に発現する。P-セレクチンは血小板だけでなく血管内皮細胞上でも発現する。血小板が活性化すると、血小板の α 顆粒内に存在する P-セレクチンが細胞膜表面へと移動し、血小板表面に発現する。この P-セレクチンのリガンドは好中球・単球上に存在する PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) であり(52-55)、活性化した血小板表面に発現した P-セレクチンに PSGL-1 を介して白血球が接着する。血管内皮細胞が損傷すると、損傷部位に血小板が蓄積する。蓄積した血小板に発現した P-セレクチンに PSGL-1 を介して白血球が接着すると、rolling を起こしその後血小板表面の GP I b α と結合して血管壁へ浸潤・遊走する(56-59)。in vivo 実験においても、血小板の CD62P ノックアウトマウスでは白血球の浸潤を抑制することが報告されている(60)。血管壁へ遊走した白血球はサイトカインなどの炎症物質を放出し、炎症反応を増強する。ここで白血球とサイトカインのポジティブフィードバックが起こるとサイトカインが過剰に産生されるサイトカインストームが発生し、炎症が慢性化する原因となる。また、ステントを留置した際には浸潤した白血球から産生されるサイトカインとステントとの異物反応により放出されるサイトカインがお互いの炎症反応を促進し、過剰な新生内膜の増殖につながる。このように、活性化した白血球はサイトカインや成長因子を放出することで平滑筋細胞の活性化を引き起こし過剰増殖につながり、ステント内再狭窄が起こる(61-63)。

また、CD62P が好中球、単球上の PSGL-1 に結合すると、それが引き金となって白血球が活性化される(64)。活性化した白血球は血小板活性化因子(platelet-activating factor: PAF)を放出する。PAF には強力な血小板凝集作用があり、血栓形成を促進する。単球

からは凝固因子である tissue factor (TF) の放出が促進され(65)、より血栓形成が進むと予想できる。

F-DLC 膜は CD62P の発現を抑制することで、白血球の活性化を抑制し、その後にく血栓形成や白血球の浸潤・遊走による炎症反応を抑えることができると考えられる。

金属イオンも血小板の接着や CD62P の発現に関与する。DLC 膜を SUS 表面にコーティングすると、金属イオンの溶出を抑制し血小板の CD62P の発現を抑制するという報告がある(66)。また、ニッケルは血小板接着を促進させることもわかっている(67)。SUS316L はクロムとニッケル、モリブデンを含む金属であり、これらの金属イオンの溶出は血栓形成を進めると考えられる。F-DLC 膜においても同様に金属イオンの溶出を抑制し、血小板の接着や CD62P の活性化を抑制したと考えられる。

以上より、F-DLC 膜は抗血栓性と抗炎症性を持つことが示唆された。

3-3-2 白血球に対する F-DLC 膜の評価実験結果

[白血球接着数]

F-DLC-coated SUS disc、F-DLC-uncoated SUS disc に接着した好中球の写真を Fig. 16 に示す。F-DLC-coated SUS disc 表面の方が F-DLC-uncoated SUS disc 表面よりも好中球の接着数が少ないことがわかる。好中球接着数の平均値を Fig. 17 に示す。好中球にお

いても血小板と同じように F-DLC-coated SUS disc への接着数が少なく、有意差が認められた (Mann-Whitney's U test、 $p < 0.001$) 。

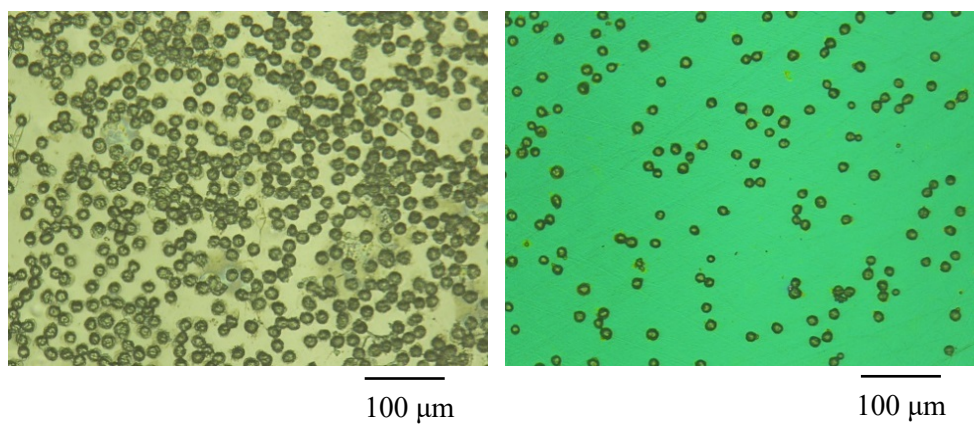


Fig. 16 Representative pictures of granulocytes adhered to the F-DLC-coated and -uncoated SUS discs. *Left*: F-DLC-uncoated SUS disc, *Right*: F-DLC-coated SUS disc. The number of granulocytes adhered to F-DLC-coated SUS discs was significantly lower than that to F-DLC-uncoated SUS discs.

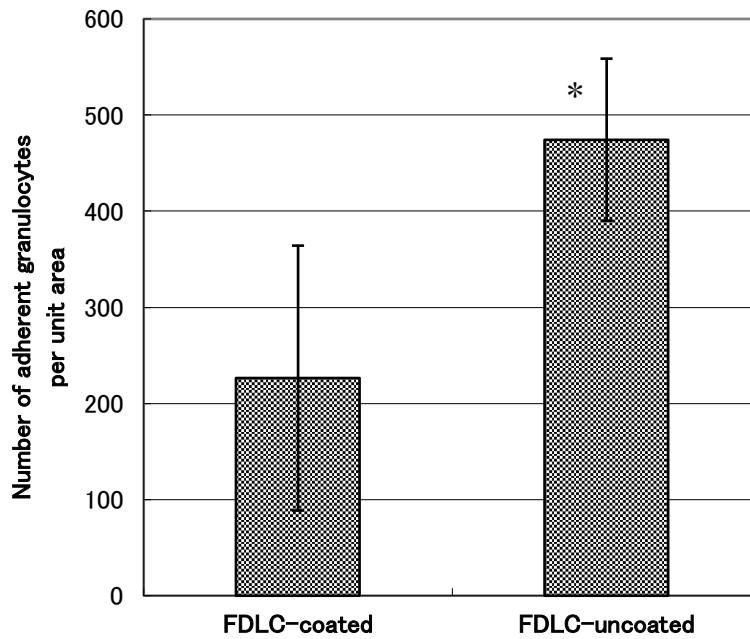


Fig. 17 The mean number of granulocytes adhered to F-DLC-coated and -uncoated SUS discs. Results are the mean \pm SD. The mean number of adhered to F-DLC-coated SUS discs was significantly lower than that to F-DLC-uncoated SUS discs (N=3, Mann-Whitney's U test, $p < 0.001$).

[白血球から産生されたサイトカイン]

F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc に接触した白血球浮遊液の上清中のサイトカインを測定した。Table 6-1、6-2 にその結果を示す。IL-1 β 、IL-5、IL-1 α 、

NGF- β はどのサンプルにおいても濃度が薄く、検出できなかった。IL-4、IL-6、IL-7、MIP-1a、SCF では測定結果が検出範囲外のサンプルがあったため N 数が少なくなった。F-DLC-coated SUS disc では炎症性サイトカインである IL-8 の産生量が多い傾向にあった (F-DLC-coated SUS disc=134.7 \pm 25.4、F-DLC-uncoated SUS disc=120.4 \pm 23.8、Wilcoxon signed-rank test、 $p < 0.05$)。その他のサイトカインでは有意な差は認められなかった。

Table 6-1 Concentrations of cytokines in the supernatant from Leukocytes exposed to F-DLC-uncoated and –coated SUS discs (Group I).

	N	F-DLC-uncoated (pg/ml)	F-DLC-coated (pg/ml)	p value
IL-1 β	7	ND	ND	
IL-1ra	7	134.8 \pm 20.7	136.3 \pm 17.8	0.938
IL-2	7	18.6 \pm 1.2	16.7 \pm 0.8	0.078
IL-4	6	2.6 \pm 0.4	2.7 \pm 0.4	1.000
IL-5	7	ND	ND	
IL-6	6	3.8 \pm 0.2	4.4 \pm 0.4	0.125
IL-7	5	1.7 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	0.063
IL-8	7	120.4 \pm 23.8	134.7 \pm 25.4	0.016
IL-9	7	58.6 \pm 3.0	58.5 \pm 2.0	0.844
IL-10	7	2.4 \pm 0.3	3.0 \pm 0.6	0.297
IL-12(p70)	7	14.1 \pm 2.0	13.5 \pm 1.8	1.000
IL-13	7	3.2 \pm 0.5	3.3 \pm 0.4	1.000
IL-15	7	50.0 \pm 2.5	46.8 \pm 1.6	0.156
IL-17	7	71.3 \pm 7.2	77.0 \pm 6.5	0.219
Eotaxin	7	18.5 \pm 3.5	16.9 \pm 3.3	0.938
FGF-basic	7	13.7 \pm 0.7	13.7 \pm 0.8	1.000
G-CSF	7	77.8 \pm 4.9	81.3 \pm 7.2	1.000
GM-SCF	7	768.7 \pm 13.9	761.4 \pm 11.8	0.938
IFN- γ	7	242.6 \pm 23.7	257.3 \pm 23.6	0.156
IP-10	7	18.7 \pm 2.3	19.6 \pm 2.2	0.469
MCP-1	7	6.9 \pm 0.9	6.9 \pm 0.8	0.844
MIP-1 α	6	42.4 \pm 13.2	46.0 \pm 15.5	0.313
MIP- β	7	293.5 \pm 71.5	310.0 \pm 77.6	0.469
PDGF-BB	7	1379.4 \pm 273.5	1595.9 \pm 326.6	0.375
RANTES	7	5131.4 \pm 1022.4	5226.9 \pm 940.6	0.813
TNF- α	7	257.3 \pm 61.7	269.0 \pm 62.9	0.469
VEGF	7	74.1 \pm 7.9	71.1 \pm 8.1	0.156

N: sample number

The level of IL-8 was found to be significantly increased in the supernatant from leukocytes exposed to F-DLC-coated compared to those exposed to F-DLC-uncoated SUS discs (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.05$). ND was out of detection range.

Table 6-2 Concentrations of cytokines in the supernatant from Leukocytes exposed to F-DLC-uncoated and –coated SUS discs (Group II). No significant differences were observed in group II cytokines. ND was out of detection range.

	N	F-DLC-uncoated (pg/ml)	F-DLC-coated (pg/ml)	p value
IL-1 α		ND	ND	
IL-2R α	7	95.0 \pm 5.8	93.0 \pm 4.4	0.750
IL-3	7	209.1 \pm 11.3	223.7 \pm 9.9	0.578
IL-12(p40)	7	827.4 \pm 36.9	835.0 \pm 58.0	0.688
IL-16	7	130.7 \pm 12.2	120.1 \pm 12.4	0.469
IL-18	7	6.7 \pm 0.6	6.2 \pm 0.5	0.625
CTACK	7	49.4 \pm 1.8	48.8 \pm 1.7	0.813
GRO- α	7	65.8 \pm 9.1	62.4 \pm 9.5	0.438
HGF	7	437.1 \pm 85.1	431.5 \pm 86.0	0.688
IFN- α 2	7	33.8 \pm 1.5	31.9 \pm 2.3	0.625
LIF	7	93.7 \pm 6.0	86.6 \pm 2.8	0.578
MCP-3	7	4.9 \pm 0.4	5.2 \pm 0.5	0.672
M-CSF	7	13.4 \pm 1.0	12.2 \pm 1.2	0.219
MIF	7	294.0 \pm 39.8	270.9 \pm 32.8	0.156
MIG	7	30.5 \pm 4.9	29.4 \pm 3.6	0.438
NGF- β		ND	ND	
SCF	6	2.2 \pm 0.3	2.0 \pm 0.4	0.844
SCGF- β	7	2569.1 \pm 533.6	2633.4 \pm 550.7	0.688
SDF-1 α	7	134.6 \pm 6.7	142.7 \pm 5.1	0.156
TNF- β	7	3.9 \pm 0.5	4.4 \pm 0.5	0.813
TRAIL	7	32.9 \pm 1.7	33.2 \pm 2.4	0.813

N: sample number

[考察]

炎症が起こると、血管内皮細胞上に接着分子である E-セレクトインと P-セレクトインが発現する。また、活性化した白血球上には L-セレクトインが発現する。これらの接着分子を介して、白血球は血管内皮細胞に弱く結合して接着し、内皮細胞表面を転がる (rolling)。その後、血管内皮細胞の ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)、VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) と白血球の細胞表面のインテグリンである LFA-1 (lymphocyte functional antigen-1, CD11a/CD18)、Mac-1 (CD11b/CD18)、VLA-4 (very late antigen-4) が結合し、強固に接着して内皮細胞間を通過して血管壁へ遊走していく。遊走した白血球はサイトカインを放出し、炎症反応を増強する。このように、白血球の接着は炎症反応の初期反応であり、白血球の接着を抑制することでその後続く炎症反応を抑えることができる。

F-DLC 膜をコーティングすると血小板と同じように好中球の接着数も減少した。炎症反応の始まりである好中球の接着を抑制することで、その後続く好中球の浸潤・遊走を抑制し、炎症を抑制すると考えられる。

好中球の膜表面は負電荷を帯びており、活性化して脱顆粒すると好中球の膜表面の負電荷が減少して接着が促進される(68)。血管内皮細胞も膜表面は負電荷を帯びており、電気的な反発により好中球は血管内皮細胞に接着することなく血管内を循環できる(69)。F-DLC 膜の表面には電気陰性度の高いフッ素が存在しており、血管内皮細胞と

同様に負電荷を帯びていると思われる。そのため、膜表面が負電荷を帯びている好中球は接着しにくいと考えられる。

好中球はニッケルイオンにより活性化し、楕円形に変形して遊走スピードがあがることが報告されている(70, 71)。また、DLC コーティングすることでイオンの溶出が抑えられることがわかっている(66)。F-DLC コーティングは DLC コーティングの H のかわりに F が一部結合したものであり、DLC と同様にイオンの溶出を抑制できると予想される。SUS はニッケルを含む金属であり、ニッケルイオンの溶出が減少したことにより、白血球の接着が抑制できた可能性がある。

細胞が浮遊している培地の表面張力が細胞の表面張力よりも低い場合、基質の表面張力が増加すると細胞接着が増加すると言われており、BSA を含んだ培地内の好中球でもその傾向が見られる(72)。F-DLC 膜は疎水性であることがわかっており、表面自由エネルギーが低い。白血球は表面張力の低い培地内におり、F-DLC 膜の表面張力は SUS よりも小さいため、接着が抑制されたと考えられる。また、基質表面が疎水性になると活性化した好中球の移動度が増加するが、血漿タンパク存在下では逆に減少するとの報告がある(73)。生体内では血漿タンパクが存在しており、F-DLC 膜の疎水性は好中球の移動速度を減少させ、遊走・浸潤していくのを抑制することができるかもしれない。

F-DLC-coated SUS disc 上で培養した白血球浮遊液の上清中のサイトカインを測定したところ、好中球の活性化させる炎症性サイトカインであると同時に血管新生を促進する IL-8 の産生量が F-DLC 膜をコーティングすると多い傾向にあった。

なお、本研究では白血球の生存率を高めるために、培地にアルブミンを使用している。これにより、膜表面には好中球が接着する前にアルブミン吸着が起こっていると

考えられる。しかし、in vivo 実験、in vitro 実験ともにアルブミンの吸着は白血球の凝集に関与せず、フィブリノゲンの吸着は接着を増加させるとの報告があり(74-76)、本研究においてアルブミンによる影響はないと思われる。一方でアルブミンやフィブリノゲンを吸着させると好中球の活性化が減少するとの報告もある(77)。アルブミンやフィブリノゲンが白血球の接着に関与する可能性があるため、血漿タンパク存在下で検討することが必要だと考える。

3-3-3 HUVEC による評価実験結果

[HUVEC 接着数]

F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc 上に接着した HUVEC を数え、接着数と増殖能を評価した。Fig. 18 に 3 時間後のディスク表面を示す。F-DLC-coated SUS disc にはわずかではあるが HUVEC が接着しており、F-DLC-uncoated SUS disc に接着した HUVEC と比べて広がっていた。F-DLC-coated SUS disc への HUVEC の接着数は有意に少なかった (F-DLC-coated SUS disc= 2.0 ± 0.7 cells/mm²、F-DLC-uncoated SUS disc= 71.0 ± 5.1 cells/mm²、Mann-Whitney's U test、 $p<0.001$)。

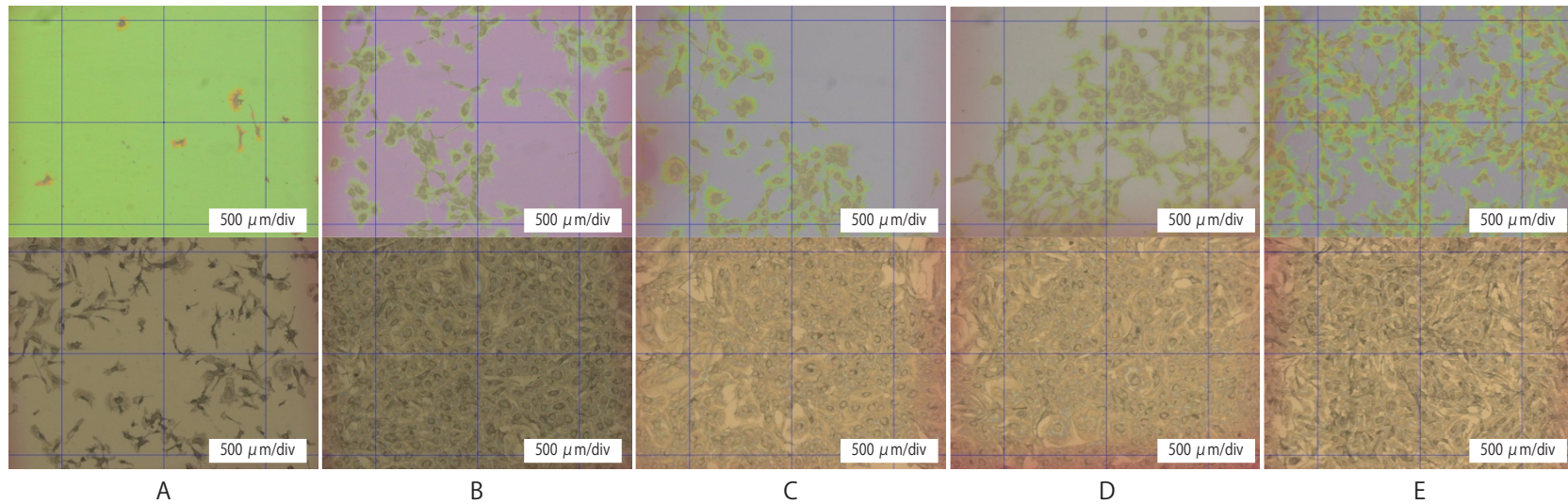


Fig. 18 Attachment of endothelial cells on the F-DLC-coated and -uncoated SUS discs, after 3h (A), 1 week (B), 2 weeks (C), 3 weeks (D), and 4 weeks (E). The discs were observed by an optical microscope. *Upper*: F-DLC-coated SUS disc, *Lower*: F-DLC-uncoated SUS disc. The number of HUVECs attached to F-DLC-uncoated SUS discs was considerably higher than that to F-DLC-coated ones at any time point. HUVECs cultured on F-DLC-uncoated SUS disc (lower) reached a subconfluency in 1 week, whereas those attached to F-DLC-coated one, slowly proliferated, not reaching a subconfluency even after 4 weeks.

[F-DLC 膜上での HUVEC 培養]

1、2、3、4 週間後の disc 表面の写真をそれぞれ Fig. 18 に示す。F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc 上で HUVEC を培養し、その増殖を時間とともに観察した結果を Fig. 19 に示す。F-DLC-coated SUS disc 上の HUVEC は 3 時間後の接着数は少ないものの、時間が経過するとともに増殖していることがわかる。F-DLC-uncoated SUS disc では 1 週間でほぼコンフルエントになり、わずかながらその後減少した。

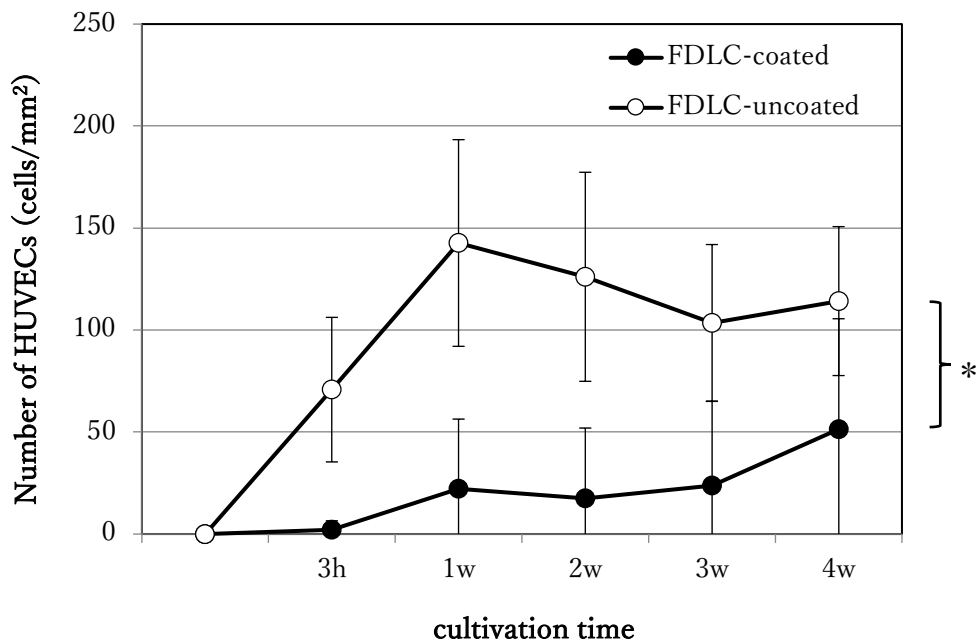


Fig. 19 The proliferative ability of HUVECs on F-DLC-coated and -uncoated SUS discs during 4 weeks. Results are the mean \pm SD. After 3h exposure, the number of HUVECs adhered to F-DLC-coated SUS discs was significantly lower compared to F-DLC-uncoated ones (Mann-Whitney's U test: $p < 0.001$) and HUVECs proliferated slowly but consistently during the 4 weeks of observation. But the number of cells counted at any time was significantly lower on F-DLC-coated compared to F-DLC-uncoated SUS discs (Mann-Whitney's U test: $p < 0.001$). On F-DLC-uncoated SUS discs, cells reached a subconfluency in 1 week, and rather a slight decrease was observed thereafter.

[HUVEC から産生されたサイトカイン]

F-DLC-coated SUS disc と F-DLC-uncoated SUS disc に接触した HUVEC の上清中のサイトカインを測定した。Table 7-1、7-2 にその結果を示す。IL-1 β 、MIP-1 α の測定値は検出範囲外であった。抗炎症性サイトカインである IL-10 と VEGF の発現が F-DLC-coated SUS disc の方が高い傾向にあった(paired t-test、 $p < 0.05$ 、Table 7-1)。

Table 7-1 Concentrations of cytokines concentration in the supernatant from HUVECs exposed to F-DLC-uncoated and –coated SUS discs (Group I).

	F-DLC-uncoated (pg/ml)	F-DLC-coated (pg/ml)	p value
IL-1 β	ND	ND	
IL-1ra	113.03 \pm 3.59	119.66 \pm 7.60	0.551
IL-2	21.81 \pm 0.80	22.99 \pm 1.73	0.608
IL-4	1.41 \pm 0.17	1.37 \pm 0.14	0.862
IL-5	2.45 \pm 0.11	2.96 \pm 0.26	0.275
IL-6	25.74 \pm 5.85	21.82 \pm 4.72	0.078
IL-7	25.82 \pm 1.42	29.51 \pm 1.50	0.265
IL-8	479.37 \pm 217.28	458.53 \pm 210.63	0.089
IL-9	109.62 \pm 1.03	113.35 \pm 2.25	0.200
IL-10	143.92 \pm 3.31	171.54 \pm 7.40	0.050
IL-12(p70)	1416.14 \pm 37.27	1580.08 \pm 22.32	0.060
IL-13	100.31 \pm 2.27	110.08 \pm 4.49	0.282
IL-15	60.07 \pm 2.53	61.30 \pm 2.59	0.771
IL-17	75.75 \pm 4.78	79.80 \pm 3.33	0.662
Eotaxin	41.78 \pm 2.72	44.36 \pm 1.57	0.580
FGF-basic	3369.59 \pm 55.83	3368.19 \pm 59.65	0.958
G-CSF	80.94 \pm 5.67	82.38 \pm 3.67	0.665
GM-SCF	723.39 \pm 14.30	781.91 \pm 1.47	0.064
IFN- γ	711.33 \pm 19.21	735.74 \pm 21.37	0.218
IP-10	13.76 \pm 0.26	13.89 \pm 1.48	0.940
MCP-1	55.40 \pm 18.31	47.81 \pm 13.26	0.319
MIP-1 α	ND	ND	
MIP- β	6.12 \pm 0.22	5.61 \pm 0.09	0.237
PDGF-BB	82.97 \pm 12.10	90.25 \pm 9.44	0.137
RANTES	1.22 \pm 0.61	1.32 \pm 0.66	0.300
TNF- α	15.33 \pm 0.29	14.62 \pm 1.07	0.551
VEGF	7688.71 \pm 92.02	8368.10 \pm 216.69	0.043

The level of IL-10 and VEGF were found to be significantly increased in the supernatant from HUVECs exposed to FDLC-coated compared to those exposed to FDLC-uncoated SUS discs (Wilcoxon signed-rank test, $p < 0.05$). ND was out of detection range.

Table 7-2 Concentrations of cytokines in HUVECs (Group II). No significant differences were observed in group II cytokines. ND was out of detection range.

	F-DLC-uncoated (pg/ml)	F-DLC-coated (pg/ml)	p value
IL-1 α	ND	ND	
IL-2Ra	79.21 \pm 8.97	86.99 \pm 4.88	0.370
IL-3	210.41 \pm 14.82	218.65 \pm 8.82	0.742
IL-12(p40)	760.29 \pm 69.63	792.44 \pm 64.71	0.584
IL-16	60.05 \pm 10.04	56.04 \pm 3.29	0.727
IL-18	3.94 \pm 0.71	4.55 \pm 0.61	0.665
CTACK	45.43 \pm 0.41	51.79 \pm 3.33	0.163
GRO- α	21.79 \pm 1.28	22.95 \pm 1.22	0.587
HGF	14.41 \pm 0.33	17.42 \pm 1.85	0.189
IFN- α 2	27.06 \pm 3.09	27.95 \pm 3.00	0.897
LIF	89.88 \pm 5.02	83.08 \pm 6.45	0.555
MCP-3	5.04 \pm 1.22	5.26 \pm 0.47	0.822
M-CSF	10.53 \pm 1.44	9.15 \pm 0.39	0.350
MIF	731.81 \pm 228.89	624.26 \pm 155.06	0.618
MIG	ND	ND	
NGF- β	ND	ND	
SCF	13.17 \pm 1.55	12.05 \pm 0.66	0.510
SCGF- β	2716.16 \pm 478.79	2724.45 \pm 82.76	0.987
SDF-1 α	131.86 \pm 2.90	141.56 \pm 5.55	0.322
TNF- β	5.89 \pm 0.15	5.91 \pm 0.62	0.981
TRAIL	27.29 \pm 3.66	26.18 \pm 3.27	0.841

[考察]

HUVEC の接着数は F-DLC-uncoated SUS disc の方が多く、増殖も早かった。1 週間でほぼコンフルエントになった。F-DLC コーティングをすると少ないが HUVEC が接着し、増殖することが確認できた。F-DLC-coated SUS disc では 4 週間培養することでニアコンフルまで増殖することができた。F-DLC-coated SUS disc 上で細胞が接着・生存し続け増えることが可能であることがわかった。増殖速度が非常に緩やかだったことは、細胞数が少なすぎることも原因として考えられる。

ミニブタを使用した実験において、F-DLC をコーティングしたステントとコーティングしていない SUS ステントの比較をしたところ、2 週間、4 週間時点での被覆率は同等であり被覆の阻害は認められず、かつ F-DLC をコーティングしたステントでは新生内膜過増殖を抑制した(78)。F-DLC 膜をコーティングすると *in vitro* 実験では F-DLC-uncoated SUS disc に比べて初期の細胞の接着が少なかったが、4 週間程度で差が縮小する傾向が見られ、*in vivo* 実験において十分な細胞接着・増殖が確認され、足場としての役割を十分果たすことと合致する。また、新生内膜増殖を抑制することも確認されており、多くの細胞が接着しすぐにコンフルエントになった SUS は細胞の接着・増殖が過剰なのかもしれない。

血管内に留置したステントが新生内膜によって被覆されるにはステントストラッド周囲から血管内皮細胞が遊走してくる、もしくは血中を循環している血管内皮前駆細胞が接着する必要がある。血管内皮細胞や血管内皮前駆細胞が基質に接着するには足場となる接着性タンパク質である細胞外マトリクスが必要となる。血管内皮細胞、血

管内皮前駆細胞の接着に関与する細胞外マトリクスにはフィブロネクチンがある。タンパク質は疎水基と親水基で構成されている。タンパク質の吸着には疎水基が関与しており、疎水性相互作用により吸着する。タンパク質の構造により変化するため一概には言えないが、疎水性を向上させるとタンパク質は吸着しやすくなる。フィブロネクチンは基質の疎水性が増すとより吸着し、フィブロネクチンをコーティングすると血管内皮細胞がより接着する(79)。疎水性を向上させることで血清中のフィブロネクチンやその他の接着性タンパク質の吸着を増加させ細胞接着を促進できるが、その一方で疎水性が非常に高いと細胞が接着しにくくなる(80)。一概に疎水性・親水性だけで片付けられないのは、タンパクの吸着が疎水性相互作用だけでなく、基質表面の官能基など多くの条件が影響するためと考えられている。また、疎水性が非常に高いと吸着したアルブミンの他のタンパクへの置きかわりがおきづらくなり血管内皮細胞の接着が抑制される(81)。DLC にフッ素を添加すると、HUVEC の接着が減少することがわかっている(21)。本研究でも同様に F-DLC-coated SUS disc では HUVEC の接着が減少した。F-DLC 膜は SUS よりも疎水性になっており、その高い疎水性のために serum に含まれる細胞接着性タンパク質とアルブミンとの置きかわりを抑制したため、細胞接着を抑制したと考えられる。また、一般的に疎水性を示すものは親油性であることが多いが、フルオロカーボン基は疎水性でありながら、油になじまない特殊な性質を持ち、様々な物質を弾く。フルオロカーボン基があるとフィブロネクチンなどのタンパク質が吸着しにくくなっており、疎水性相互作用により吸着しても非常に低い表面エネルギーで安定しているため脱着しやすいのではないかとの報告もある(82)。F-DLC 膜もフルオロカーボン基が膜表面に存在し、フィブロネクチンなどの接着性タンパク質の吸着を減少させ、HUVEC の接着が減少したと考えられる。

HUVEC の表面に存在する糖タンパクは極性を持ち、負に分極している。膜表面のフッ素が極性を持ち負に偏っている帯電していることも接着を抑制している一因であると考えられる。

DLC 膜を SUS 表面にコーティングすると、SUS からの金属イオンの溶出を抑制することがわかっている(66)。SUS はニッケルを含み、ニッケルなどの金属イオンはただちに血管内皮細胞の ICAM-1、VCAM-1、E-selectin を活性化する(83)。これらの接着分子が非特異的に SUS と結合し、SUS にはより多くの HUVEC が接着したのかもしれない。

HUVEC の上清中のサイトカインを測定したところ、抗炎症性サイトカインである IL-10 と血管内皮細胞増殖因子 VEGF の産生量が F-DLC 膜では多い傾向にあった。