

■Original article

過酸化水素の毒性評価における 直接細胞接触法およびコラーゲンゲル包埋培養法の有用性

高野 海哉^{*1}, 小林 寛伊^{*1}, 竜 瑞 之^{*2}^{*1} 東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科^{*2} サラヤ株式会社 バイオケミカル研究所

The usefulness of the direct contact method and the collagen gel cell culture method in the toxicity assessment of hydrogen peroxide

Kaiya Takano^{*1}, Hiroyoshi Kobayashi^{*1}, Mizuyuki Ryu^{*2}^{*1} Division of Infection Prevention and control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School^{*2} Saraya Co.Ltd, Biochemical Laboratory**要旨：****目的：**過酸化水素の細胞に対する影響を評価するため、直接細胞接触法とコラーゲンゲル包埋培養法が有効であるかを確認することを目的とした。**方法：**細胞は HeLa 細胞を用いた。直接細胞接触法では、滅菌蒸留水で希釈して濃度を 0.003%・0.006%・0.03%・0.06%・0.3%・0.6%・3%とした過酸化水素を 10 分間 HeLa 細胞に作用させ、細胞生存率を算出した。コラーゲンゲル包埋培養法では、HeLa 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に 3%過酸化水素内に 10 分間浸漬したシリコンチューブを埋め込み、細胞の生存を観察した。**結果：**HeLa 細胞では、直接細胞接触法によって過酸化水素濃度が 0.3%以上で濃度依存的に細胞生存率が減少することがわかった。コラーゲンゲル包埋培養法では、過酸化水素に浸漬し風乾させずにコラーゲンゲル内に埋め込んだシリコンチューブの周辺の細胞が死滅することが示された。**結論：**直接細胞接触法は、培養液中の有機物に及ぼす過酸化水素の影響を除外して培養細胞に対する影響を評価する方法として有用であることが示唆された。また、コラーゲンゲル包埋培養法は、過酸化水素で処理をした試験材料を培養細胞含有ゲル内に埋め込むことで、細胞に対する影響を直接かつ 3 次元的に評価する方法として有用であることが示唆された。

Key words : toxicity, direct contact method, collagen gel cell culture,
hydrogen peroxide

はじめに

過酸化水素はこれまで消毒薬として用いられてきたが、近年、内視鏡など高温や高压に耐えられない医療機器・器具・材料を滅菌するために用いられるようになってきた¹⁾。

しかし、過酸化水素は強力な酸化作用を有するために、過酸化水素を用いた滅菌業務において、その従事者に対

する影響が懸念されている²⁾。そして、過酸化水素の強力な酸化作用による様々な組織や細胞に対する影響が指摘され、過酸化水素の毒性について検討されている³⁻⁵⁾。

消毒薬や滅菌剤の毒性を評価するため、培養細胞において、3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) をホルマザン色素へ還元する酵素反応を利用した MTT 法という in vitro 系の評価法が用いられている⁶⁾。しかし、過酸化水素は発生する活性酸素がタンパク質などの高分子化合物を酸化させる作用が強いため、

細胞培養に用いられる培養液に含まれる有機物と反応してしまうことが懸念される⁷⁾。

竜らは、過酢酸製剤とオルソフタルアルデヒド製剤を培養液中に添加せず直接細胞へ作用させる直接細胞接触法を開発し、その毒性を評価した⁸⁾。この評価方法では、消毒薬や滅菌剤が細胞培養で用いる培養液に含まれる様々な有機物と反応せず、細胞に対する消毒薬や滅菌剤の直接的な影響を検討することができる利点がある。

また、竜らは、コラーゲンゲルを用いた包埋培養系を開発し、滅菌物に残留したグルタラルによる細胞への毒性を評価した⁹⁾。この方法で、滅菌物に残留した消毒薬や滅菌剤の生体に対する影響を3次元的に評価することができ、滅菌物に残留した過酸化水素の細胞に対する影響を評価するために有用であると考えた。

1. 目 的

本研究は、直接細胞接触法を用いることで、培養液中の有機物に対する過酸化水素の影響を除外して過酸化水素の細胞に対する影響を評価するために有効であることを確認することを目的とした。さらに、コラーゲンゲル包埋培養法が培養細胞に対する滅菌物に残留した過酸化水素の毒性を評価することにおいて有効であることを確認することを目的とした。

2. 方 法

2.1 直接細胞接触法

HeLa 細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し、10% ウシ胎児血清 (Fatal bovine serum : FBS) 添加イーグル最少必須培地 (Eagle's minimal essential medium : MEM) で 72 時間、CO₂ 濃度 5%・37℃のインキュベーター内で培養し安定化した。

培養液を除去し、リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline : PBS) で洗浄し、滅菌蒸留水で濃度が 0.003%・0.006%・0.03%・0.06%・0.3%・0.6%・3% となるように希釈した過酸化水素を各ウェルの細胞に添加し、10 分間細胞に直接作用させた。対照群として、過酸化水素を添加しない滅菌蒸留水を同様に 10 分間作用させた。

過酸化水素を作用させたことによる細胞の生存率を算出するため、MTT を 0.5 mg/mL 含む 10%FBS 添加 MEM

培地を添加し、5%CO₂・37℃で 2 時間インキュベートした。

2 時間後、各ウェルの MTT 添加培地を除去し、イソプロパノールを加えて室温で 30 分間静置して生存していた細胞が生成したホルマザン色素を抽出して 570nm の吸光度を測定した。

吸光度より細胞生存率を算出した。細胞生存率は、(過酸化水素作用後の細胞) / (過酸化水素未処理の細胞) × 100 で算出した。

2.2 コラーゲンゲル包埋培養法

培養細胞の包埋に、細胞培養用コラーゲン (Cellmatrix[®] I-A・新田ゼラチン) を用いた。培養器として 6 穴のトランズウェルパームアブルサポート (Corning 社製・カタログ番号 3414) を用いた。HeLa 細胞を細胞数が 1 ウェルあたり 5×10⁴ cells となるように、Cellmatrix[®] I-A を製品のプロトコールにしたがって懸濁し、トランズウェルバリアブルサポートのインサート内に 1.5mL ずつ分注し、5%CO₂・37℃インキュベーター内で 30 分間静置し細胞懸濁液をゲル化させた。

コラーゲンゲル化後、インサートが挿入されているマルチウェルプレート内に 10%FBS 添加 MEM 培地を 2mL 加え、5%CO₂・37℃インキュベーターにて 48 時間培養し、コラーゲンゲル内に培地成分を浸透させ、ゲル内の細胞を安定化した。

コラーゲンゲルに埋め込むシリコンチューブ片は、5mm 径のシリコンチューブを 5mm の長さに切断したものを用いた。シリコンチューブ片は洗浄後 UV 照射により 2 時間滅菌し、以降の実験操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。チューブ片の処理は、対照群として紫外線殺菌灯による紫外線照射で滅菌後過酸化水素に浸漬しなかったチューブ片、紫外線照射後 3%過酸化水素に 10 分間浸漬し引き上げ風乾させないチューブ片、紫外線照射後 3%過酸化水素に 10 分間浸漬し引き上げたのち 30 分間クリーンベンチ内で風乾させたチューブ片とした。

6 穴のトランズウェルバリアブルサポートのインサート内の細胞懸濁コラーゲンゲル内に処理した各チューブ片を垂直に挿入し埋没させ、5%CO₂・37℃インキュベーター内で 24 時間培養した (図 1)。

24 時間培養後、マルチウェル内の培養液を MTT を 0.5mg/mL 含む MEM 培地と交換し、5%CO₂・37℃インキュベーターで 2 時間培養し、生存した細胞に MTT を

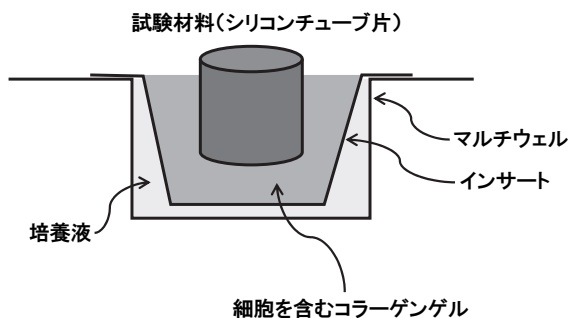


図1 トランズウェルバリアブルサポート (Corning 社製) を用いたコラーゲンゲル包埋培養法を示す模式図

取り込ませた。マルチウェル内の MTT 添加培地を除去し、PBS をウェル内に加えて 10 分間静置後除去し、再び PBS を加えた。この操作を 3 回繰り返す、コラーゲンゲル内の MTT 添加培地を除去し、生存していた細胞により生成された青色のホルマザン色素を観察しやすくし、写真撮影を行った。

3. 結果

3.1 直接細胞接触法

直接細胞接触法を用いて HeLa 細胞に対して過酸化水素を作用させた結果を図 2 に示す。本研究では、直接細胞接触法を行った過酸化水素濃度 0.003%、0.006%、0.03%、0.06%、0.3%、0.6%、3% の各濃度において、各々の実験例数は 9 であった。

図 2 に過酸化水素を直接 HeLa 細胞に作用させた直接細胞接触法の結果を示す。過酸化水素濃度が 0.003～0.06% では細胞生存率は 80% 以上を保っていたが、濃度が 0.3% になると約 50% に低下した。HeLa 細胞では過酸化水素濃度が 0.3% 付近より顕著な細胞生存率の低下がみられ、濃度 0.3% 以上では濃度依存的に細胞生存率が低下していた。

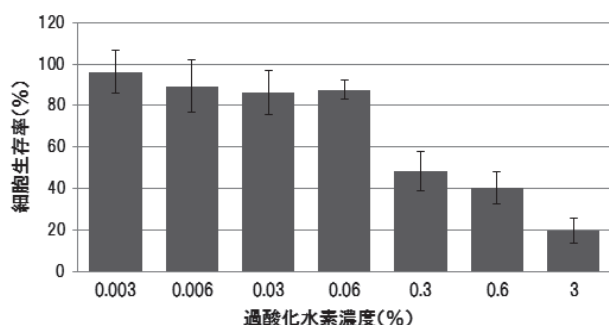


図2 直接細胞接触法による過酸化水素の HeLa 細胞に対する影響

3.2 コラーゲンゲル包埋培養法

コラーゲンゲルで HeLa 細胞を包埋し、試験材料としてシリコンチューブ片を埋め込み、MTT 添加培地で 2 時間培養した結果を図 3 に示した。本研究では、コラーゲンゲル包埋培養法を行った実験例数は 3 であった。

紫外線照射により滅菌し 3% 過酸化水素に浸漬しなかったシリコンチューブを埋め込んだ細胞含有コラーゲンゲルを図 3 の A に示した。埋め込まれたチューブの周辺はホルマザン色素による青色を呈し、紫外線照射により滅菌したシリコンチューブ片の周囲では細胞は死滅しないことが示された。

3% 過酸化水素に 10 分間浸漬し、引き上げて風乾させずにゲル内に埋め込んだ細胞含有コラーゲンゲルを図 3 の B に示した。チューブ片を中心にホルマザン色素による青色を呈さない無色の領域があり、この領域は細胞が死滅したことが示された。すなわち、紫外線照射後 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬し、風乾せずにゲル内に埋め込んだチューブ片の周辺では細胞が死滅したことが示された。

紫外線照射後 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬し、引き上げて 30 分間クリーンベンチ内で風乾させたチューブ片を細胞含有コラーゲンゲル内に埋め込んだ結果を図 3 の C に示した。チューブ片周辺はホルマザン色素による青色を呈し、3% 過酸化水素に浸漬後 30 分間風乾させたチューブ片の周辺は細胞が死滅しないことが示された。

4. 考 察

本研究で、直接細胞接触法では、過酸化水素と培養液に含まれるタンパク質などの有機物と反応していないため、濃度が 0.3% 以上になると顕著に細胞生存率が低下したのは過酸化水素が直接細胞に影響した結果であると考えられる。

直接細胞接触法では、過酸化水素など作用させる消毒剤は滅菌蒸留水で希釈した。予備実験で、滅菌蒸留水のみを 10 分間培養細胞に作用させても、細胞の生存率は低下しないことを確認した。よって、10 分間程度では滅菌蒸留水による浸透圧の影響は培養細胞の生存に影響しないと考えられる。

本研究では HeLa 細胞を用いて直接細胞接触法を行ったが、ほかの細胞株を用いることで、細胞株による過酸化水素の影響の違いを検討することができ、様々な組織

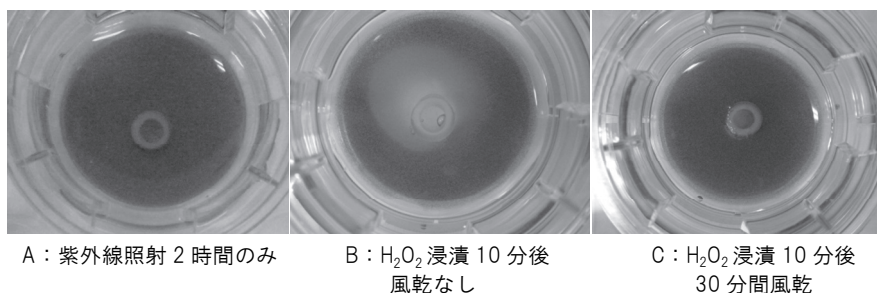


図3 コラーゲンゲル包埋培養法の結果

A は紫外線照射 2 時間により滅菌したシリコンチューブ片をゲル内に埋め込んだもの。MTT を取り込みホルマザン色素を生成した細胞がゲル内に一様にみられる。

B はシリコンチューブ片を 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬した後、風乾させずにゲル内に埋め込んだもの。チューブ片を中心にホルマザン色素による青色を呈しない部位がみられ、細胞が死滅していたことを示す。

C は 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬した後、クリーンベンチ内で 30 分間風乾させてゲル内に埋め込んだもの。チューブ片の周辺はホルマザン色素による青色を呈し、細胞は死滅しなかったことを示す。

や細胞に対する影響を検討することができる。さらに、様々な種類の消毒剤を直接細胞接触法で評価することで、過酸化水素の細胞に対する毒性と比較検討し過酸化水素に特有な影響を検討することが可能であろう。

コラーゲンゲル包埋培養法において、シリコンチューブ片を 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬し取り出して風乾せずにゲル内に埋め込んだ場合、図 3 の B に示したようにシリコンチューブ片の周囲ではゲル内の細胞が死滅した結果となった。過酸化水素がチューブ片に残留していたため、チューブ片周辺の細胞が死滅したと推測できる。また、図 3 の C に示したように過酸化水素に 10 分間浸漬後 30 分間クリーンベンチ内で風乾したチューブ片の周辺では細胞は死滅していなかったことから、チューブ片に付着していた過酸化水素は十分に風乾させたことで細胞を死滅させない濃度に低下していたことが推察できる。

これらの結果から、コラーゲンゲル包埋培養法において、ゲル内のホルマザンをイソプロパノールで抽出し吸光度を測定してゲル内に生存していた細胞や細胞生存率を計測することや、試験材料周囲で死滅した細胞のためにホルマザンが検出されない領域の面積を計測することで、細胞毒性を評価するために汎用されている MTT アッセイ法と同様に定量的な評価が可能であると考えられる。

さらに、コラーゲンゲル包埋培養法では滅菌した材料をゲル内の培養細胞に直接作用させるため、材料に過酸化水素が残留した状態で細胞に対する毒性を評価することができ、従来の MTT アッセイ法による *in vitro* の毒性評価よりもより *in vivo* に近い状況で 3 次元的に過酸化水

素の生体に対する影響を評価することができると思う。

謝 辞

本研究を行うに当たり、多大なご協力を頂いたサラヤ株式会社 バイオケミカル研究所 石井七瀬氏に深く感謝申し上げます。

■ 文 献

- 1) Shintani H. Application of vapor phase hydrogen peroxide sterilization to endoscope. *Biocontrol Sci* 2009;14:39-45.
- 2) Yoshida R, Kobayashi H. Adverse Events with Low Temperature Hydrogen peroxide Gas Plasma Sterilisation Reported by Certified Sterilisation Service Technicians and Certified Sterilisation Specialists in Japan. *Jpn J Med Instrument* 2013;83:28-33.
- 3) Watt BE, Proudfoot AT, Vale JA. Hydrogen peroxide poisoning. *Toxicol Rev* 2004;23:51-7.
- 4) Konyonenbelt BJ, Mlnarik DS, Ubels JL. Effects of peroxide-based contact lens-disinfecting systems on human corneal epithelial cells *in vitro*. *Eye Contact Lens* 2011;37:286-97.
- 5) Pan Q, Qiu WY, Huo YN, Yao YF, Lou MF. Low levels of hydrogen peroxide stimulate corneal epithelial cell adhesion, migration, and wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:1723-34.
- 6) Iwasawa A, Nakamura Y. Cytotoxic effect of antiseptics: comparison *In vitro*. *In vivo* examination of strong acidic electrolyzed water, povidone-iodine, chlorhexidine and benzalkonium chloride. *Kansenshogaku Zasshi* 2003;77:316-22.
- 7) Finnegan M, Linley E, Denyer SP, McDonnell G, Simons C, Maillard JY. Mode of action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms. *J Antimicrob Chemother* 2010;65:2108-15.
- 8) Ryu M, Matsumura R, Quan G, Furuta T. Comparison of the Cytotoxicity of High-Level Disinfectants by the MTT Assay and Direct Contact Assay. *Biocontrol science* 2013;18:in press.
- 9) Ryu M, Kobayashi T, Kawamukai E. Cytotoxicity Assessment of Residual High-Level Disinfectants. *Biocontrol science* 2013;18:in press.

The usefulness of the direct contact method and the collagen gel cell culture method in the toxicity assessment of hydrogen peroxide

Kaiya Takano^{*1}, Hiroyoshi Kobayashi^{*1}, Mizuyuki Ryu^{*2}

^{*1} Division of Infection Prevention and control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School

^{*2} Saraya Co.Ltd, Biochemical Laboratory

Abstract

Background: Hydrogen peroxide low temperature sterilization was considered to be the most reliable and effective sterilization for heat-labile equipments in clinical settings. However, many adverse events for the personnel engaged in the sterilization have recently been reported.

Objectives: To investigate the toxicity of hydrogen peroxide for the living cell

Methods: The direct cell contact method was used to investigate the influence of triggered hydrogen peroxide to HeLa cells, and to assess the toxicity. In addition, the silicon tube piece soaked in hydrogen peroxide was inserted into the collagen gel with HeLa cell, and then the influence on HeLa cells was examined.

Results: The results of the direct cell contact method showed that cell survival rates decreased depending on the concentration of hydrogen peroxide. The results of the collagen gel cell culture method showed that the silicon tube pieces soaked in hydrogen peroxide influenced the cells cultured in the collagen gel.

Conclusion: The results suggested that the direct cell contact method was useful to assess the influence of hydrogen peroxide on cells. Furthermore, the method to utilize the collagen gel cell culture exhibited the influence of materials sterilized by hydrogen peroxide for living cells.