

培養細胞を用いた過酸化水素による細胞毒性の検討

東京医療保健大学大学院

医療保健学研究科 博士課程

2015 年 3 月 7 日

高野 海哉

(東京医療保健大学大学院学位論文)

培養細胞を用いた過酸化水素による細胞毒性の検討

東京医療保健大学大学院

医療保健学研究科 博士課程

2015 年 3 月 7 日

高野 海哉

培養細胞を用いた過酸化水素による細胞毒性の検討

東京医療保健大学大学院
医療保健学研究科（博士課程）
感染制御学コース
学籍番号 HD012002
高野 海哉

はじめに (Introduction)

過酸化水素は、近年、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法や過酸化水素ガス低温滅菌法として医用器材の滅菌に用いられている¹⁾。過酸化水素は完全に分解されると水と酸素に分解されるが、過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルは強力な酸化作用を有するために生体毒性が強い²⁾。滅菌運転中の過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌装置より周囲環境へ過酸化水素が拡散することや³⁾、滅菌後、材質によっては滅菌された物品の表面に過酸化水素が残留するという報告がある¹³⁾。滅菌運転中に周囲環境へ放出されたり、滅菌物に残留した過酸化水素が人体に及ぼす影響を検討するため、過酸化水素が生体を構成する細胞そのものにどのような影響を及ぼすか評価する必要がある。

目的 (Objective)

直接細胞接触法を用いて培養細胞に過酸化水素を曝露した時の細胞の生存を評価すること、また、コラーゲンゲル包埋培養法を用いて、過酸化水素が付着している試験片を細胞に接触させた時のゲル内に包埋された細胞の生存を評価することで、過酸化水素の培養細胞に対する影響を検討した。

方法 (Methods)

本研究では、細胞毒性を評価するために一般的に用いられている HeLa 細胞、角膜由来の SIRC 細胞、皮膚線維芽細胞由来の HDFa 細胞、消化管粘膜上皮細胞由来の Caco-2 細胞を用いた。過酸化水素を培養液に添加せずに直接培養細胞に曝露する直接細胞接触法を用いて、各細胞に過酸化水素濃度 0.003%～3%の範囲で 10 分間曝露したときの細胞生存率を求めた。また、コラーゲンゲル包埋培養法を用いて、コラーゲンゲル内に HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞を包埋し、過酸化水素に浸漬したポリテトラフルオロエチレン製のチューブ片を試験片としてコラーゲンゲルに埋め込んでゲル内の細胞に接触させてゲル内の生存した細胞を検出し、細胞生存率を求めた。

結果 (Results)

直接細胞接触法により、すべての細胞において過酸化水素濃度が 0.3%以上になると細胞生存率が 50%以下に減少した。また、曝露した過酸化水素濃度が上昇すると、いずれの細胞も濃度依存的に細胞生存率も低下したが、SIRC 細胞と Caco-2 細胞よりも HeLa 細胞と HDFa 細胞の方が濃度依存的に細胞生存率が低下する傾向があった。

コラーゲングル包埋培養法により、3%過酸化水素水に 10 分間浸漬した後に風乾しなかった試験片が接触したゲル内の細胞は生存しなかった。また、過酸化水素に浸漬したのち 30 分間風乾した試験片では、試験片と接触していたゲル内の細胞は生存していた。

結論 (Conclusions)

直接細胞接触法によって、本研究で用いた HeLa 細胞、SIRC 細胞、HDFa 細胞、Caco-2 細胞のいずれの細胞に対しても過酸化水素を曝露したことで細胞生存率が低下する影響があった。

コラーゲングル包埋培養法によって、過酸化水素が付着していた試験片が直接細胞に接触することでゲル内の細胞が死滅することが明らかとなり、滅菌された器具に付着している過酸化水素が接触した細胞に対して細胞の生存に影響を与えることがわかった。

キーワード (Key Words)

培養細胞 過酸化水素 直接細胞接触法 コラーゲングル包埋培養法

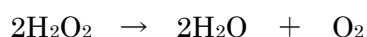
目次

はじめに	1
目的	7
方法	8
結果	
1. 直接細胞接触法の結果	11
2. コラーゲンゲル包埋培養法の結果	13
考察	19
結論	31
謝辞	32
引用文献	34
表および図	37
英文要旨 (Abstract)	58

はじめに

過酸化水素は、濃度 3%の過酸化水素水はオキシドールとして外傷の消毒に用いられることで良く知られている。

過酸化水素は化学式 H_2O_2 と表され、完全に分解されると



という化学反応式で示される通り、人体に対して無害な水 (H_2O) と酸素 (O_2) に分解される。

しかし、過酸化水素は



という反応により $\text{OH}\cdot$ (ヒドロキシルラジカル) という、水酸基 (ヒドロキシル基 (水酸基) : OH^-) に対応する不対電子を持ったフリーラジカルを生じる。ヒドロキシルラジカルは非常に反応性が高く、強力な酸化力を有する。過酸化水素やヒドロキシルラジカルは、大気中に含まれているような一般的な酸素分子が、非常に反応性の高い化合物に変化したものとして総称して活性酸素と呼ばれている。

過酸化水素からヒドロキシルラジカルを生成する反応は、遷移元素である Fe や Cu のイオン (Fe^{2+} や Cu^{2+}) によって触媒される。すなわち、



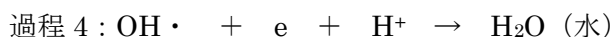
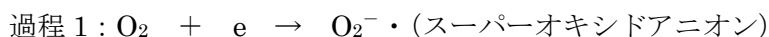
という反応式で示される。この反応をフェントン反応という。

ヒトをはじめとする多くの好気性の生物がエネルギー代謝のために環境から取り込んでいる酸素分子に対して、活性酸素は生体を構成する成分に対し酸化障害を引き起こしうる有害な分子といえる。活性酸素によって引き起こされる生体分子の酸化障害により病原微生物に対しても障害を起こすことから、滅菌剤としての効果が評価され、近年では、医療機器や医療器具、材料を滅菌するために過酸化水素、もしくは過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルを用いた滅菌法が開発され、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌装置や過酸化水素ガス滅菌装置として実用化されている¹⁾。

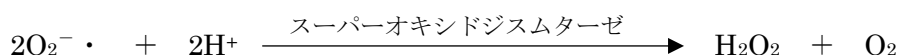
活性酸素である過酸化水素やヒドロキシルラジカルは生体分子に対する酸化障害により生体に対して非常に毒性など悪影響が強い化合物であるが、ヒトをはじめとする多くの生物を構成する好気性細胞において、酸素を用いた好氣的エネルギー代謝の過程で一般的に生じる代謝生成物でもある。

好氣的エネルギー代謝の過程では、取り込まれた酸素 1 分子は、ミトコンドリアに備わってい

る代謝系で以下の 4 段階の過程で完全に水に還元される。

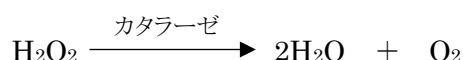


取り込まれた酸素分子の還元過程において、過程 1 で生じるスーパーオキシドアニオンラジカル ($\text{O}_2^{\cdot-}$) は酸化力の強いフリーラジカルである。酸素分子の還元過程で生じたスーパーオキシドアニオンラジカルから生体分子の酸化障害を防ぐために、好気呼吸を行う細胞にはスーパーオキシドアニオンラジカルを過酸化水素と水にするスーパーオキシドジスムターゼ (superoxide dismutase:SOD) という酵素が備わっている。すなわち、

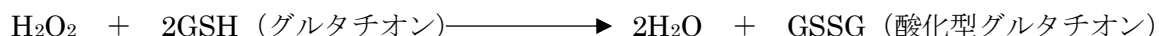


という反応により、スーパーオキシドアニオンラジカルを除去している²⁾。

過酸化水素は分子量 34 と小さく、しかも荷電していない分子なので、容易に細胞膜や細胞内小器官を構成する生体膜を通過することができ、生体内では細胞内や組織内に拡散することができるといわれている。また、過酸化水素そのものは生体成分を構成する有機基質との反応は遅いといわれる。しかし、過程 3 によって過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカル ($\text{OH}^{\cdot}$) は反応性が高く、生体分子を構成する有機化合物と容易に反応する強力な酸化作用を有する。ヒドロキシルラジカルは細胞膜の脂質の酸化や DNA の損傷を起こすことから、細胞の変性や腫瘍化を招き細胞レベルでの病変を起こし³⁾、また、細胞に対して毒性を示すとされている²⁾。細胞内には、好気呼吸の過程で発生した過酸化水素を生体に対して無害な酸素と水に分解する反応を促進する酵素であるカタラーゼ (catalase) やグルタチオンペルオキシターゼ (glutathione peroxidase:GSPx) が備わっている。すなわち、



グルタチオンペルオキシターゼ (GSPx)



という反応で、過酸化水素の除去を行っている。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンがペプチド結合したトリペプチドであり、グルタチオンペルオキシターゼの反応基質として好気呼吸を行う細胞内で活性酸素種を還元して消去するために必要な物質である。

カタラーゼやグルタチオンペルオキシターゼの触媒作用によって過酸化水素から水と酸素へ分解させる反応が促進されることで過酸化水素からヒドロキシルラジカル⁴⁾の生成が防がれており、細胞内の過酸化水素は生成と分解の平衡が保たれている状態になっている⁴⁾。

このように、好気呼吸によって生じる過酸化水素は、細胞内の酵素によって無害な水と酸素に分解される反面、過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカル⁴⁾の強力な酸化作用で生体分子を構成する有機化合物の過酸化や損傷が起こることもあり、過酸化水素の生体を構成する組織や細胞に対する毒性が指摘されている^{2,3)}。細胞内における好気呼吸の結果生じる内因性の過酸化水素の代謝については、前述のカタラーゼやグルタチオンペルオキシターゼの作用によって行われているが、0.01%の過酸化水素を含むコンタクトレンズ洗浄液でも角膜に直接接触すると角膜を構成する上皮細胞に障害を及ぼすことが指摘されているように^{5,6)}、洗浄剤や滅菌剤として用いられた外因性の過酸化水素が、内因性の過酸化水素を処理できる能力を持つ細胞に対してどのような影響を及ぼすのかについて検討する必要がある。このような観点からも、ヒドロキシルラジカル⁴⁾を生じる過酸化水素の毒性について培養細胞を用いた *in vitro* 系で毒性試験等の検討がなされている⁷⁾。

過酸化水素を滅菌剤として用いる滅菌法として、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法や過酸化水素ガス滅菌装置がある。過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法では、密閉されたチャンバー内を真空ポンプで減圧して真空状態にし、そこへ約 60%の過酸化水素を噴霧して高周波やマイクロ波を過酸化水素分子に照射することでエネルギーを与えて反応性の高いヒドロキシルラジカル⁴⁾を生成させるといわれている。この過程で生じたヒドロキシルラジカル⁴⁾が生体分子を強く酸化させることで滅菌効果を示す。この滅菌工程は 37～44℃で進行し、時間も 60～90 分で終了する。高圧蒸気滅菌のように、高温・高圧の環境下で滅菌工程が進行する滅菌法ではないので、手術機器や内視鏡のような精密な医用器具にも応用できる利点がある⁸⁾。過酸化水素低温ガス滅菌法では、滅菌工程終了後チャンバー内に生じる物質は過酸化水素の分解によって生じた水（水蒸気）と酸素であり、酸化エチレンガス法のように滅菌された物品に残留した酸化エチレンや二次生成物を除去するためのエアレーションは必要ないとされており、滅菌終了後直ちに使用したり保管したりすることが可能であるとされている¹⁾。過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌装置や過酸化水素ガス滅菌装置は、設置のために給排水設備や蒸気配管、排気ダクトなどの付帯設備が不要なために簡単に設置することができる。滅菌条件がシビアではないこと、滅菌剤の残留が少ない、あるいは二次生成物が無害・無毒な物質であるということ、設置が容易であることなど、医療機関にとって多くの利便性をもつ滅菌法であることから急速に普及してきている⁹⁾。そして、過酸化水素ガスが滅菌効果を有することを利用し、蒸気化過酸化水素発生装置（Bioquell-Z®、Bioquell 社製）を用いた病室など室内表面の殺菌^{10,11)}にも応用されてきている。

しかし、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌器において、滅菌装置の機種や使用頻度によっては、滅菌装置の滅菌チャンバー内を真空ポンプで減圧する過程で滅菌装置の周囲に 100～150ppm の過酸化水素が拡散しており、また、滅菌過程終了後、滅菌チャンバー内には 250ppm 以上の過酸化水素が残っていたことが報告されている⁹⁾。

また、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌器で滅菌されたプラスチック製の医療器材において、プラスチックの材質によっては滅菌終了直後で 300ppm、滅菌終了 1 時間が経過しても 30～70ppm の過酸化水素が材料表面から検出されたという報告もある⁹⁾。過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌器で滅菌されたプラスチック器具を、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌装置で滅菌した際に、滅菌器が滅菌条件に達していたことを示すために用いられる化学インジケータと共に滅菌バックに梱包しておく、滅菌装置に入れて滅菌工程を開始していないのにもかかわらず滅菌終了を示す化学インジケータの変色が見られた¹²⁾という報告からも、プラスチック素材でできた物品を過酸化水素ガス滅菌法を施した場合、材質によってはプラスチック素材の表面に過酸化水素が残留してしまう可能性が指摘されている^{13,14)}。過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法を、気管支鏡および膀胱・腎盂鏡のファイバースコープ部のみのダミーに対して施した際、滅菌終了直後ではファイバースコープ部より過酸化水素ガスが 50～70ppm 検出され、検出される過酸化水素濃度が 10ppm 以下に低下するまで 18～40 時間要したことが検証された¹⁵⁾。

これらの事実から、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法や過酸化水素ガス低温滅菌法では低温で滅菌プロセスが進行し、過酸化水素は最終的に水と酸素という無害な物質に分解されて滅菌終了後直ちに滅菌物を安全に使用できるという利便性が強調される一方で、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌後、滅菌装置の滅菌チャンバー内や滅菌された医用器具や材料の表面に過酸化水素が残留することが懸念されている。

さらに、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法に関連して滅菌業務の従事者に対する有害事象が報告されており、アメリカ合衆国食品医薬品局医療機器有害事象報告データベースによると、アメリカ合衆国において 2008 年 3 月 4 日から 2012 年 6 月 26 日の期間で過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌装置の操作や滅菌された物品を扱う滅菌業務従事者に対して「角膜の異常」、「鼻腔・咽頭・気道の異常」、「手指の傷害」、「異臭」、「頭痛」などの事象が挙げられている¹⁶⁾。また、吉田らは日本国内で過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法を行っている医療機関に対して過酸化水素低温ガス滅菌法に関連する有害事象の有無と内容をアンケート調査したところ、回答数 472 件のうち 28.8%にあたる 136 件が有害事象と判断される回答があり、その内訳は、手の皮膚の白色化などの異常が 29.7%、異臭が 27.9%、鼻腔粘膜の異常が 7.1%、上腕・前腕の皮膚異常が 6.3%、咽頭や喉頭の異常が 5.2%であったと報告している¹⁷⁾。このように、過酸化水素低温ガス滅菌装置の滅菌運転中や、滅菌終了後に滅菌された物品をチャンバーより取り出す際に有害事象を受傷するケースが国内外で報告されており、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌装置から漏れ出る過酸化水素や、滅菌終了直後の滅菌装置内や滅菌物の取り扱いの際に滅菌業務従事者が受ける過酸化水素の影響が懸念されている。そして、滅菌された医用器材に過酸化水素が付着・残留したまま人体に使用された場合、生体や接触した組織に対してどのような障害を生じるのか懸念される。

よって、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法や過酸化水素ガス低温滅菌法において過酸化水素が滅菌された医用器材に残留していた場合、滅菌物に残留していた過酸化水素が患者や検査を受

ける被験者に使用されて皮膚や粘膜など生体組織に触れてしまった場合にどのような影響を及ぼすのか検証する必要がある。また、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌装置を用いて滅菌業務を行っている滅菌従事者に対して、使用している状況や条件によって滅菌運転中に滅菌器から周囲へ過酸化水素ガスが放出されてしまったり、滅菌運転終了直後のエアレーションは必要ないとはされているが、滅菌チャンバー内や滅菌された物品の材質や形状によっては滅菌物の表面に過酸化水素が残留していることを考え、過酸化水素を滅菌業務従事者が吸入したり触れたりした際にどのような影響を及ぼすのかを検証する必要がある。

本研究では、実際に過酸化水素が生体組織に及ぼす障害や副作用の程度を検討するために、過酸化水素そのものが、直接、細胞に対してどのような影響を及ぼすのかを検討することを試みた。

様々な物質の毒性を評価するために、ヒトをはじめ様々な哺乳類動物の様々な組織由来の培養細胞を用いた評価が行われている¹⁸⁾。培養細胞を用いた毒性の評価には、細胞を培養する培養液に試験物質を加えて培養細胞に作用させたのち、生存した細胞に培養液中に添加した 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を取り込ませて生細胞が持つミトコンドリアに備わっている代謝系でホルマゼン色素へ還元する反応を利用した MTT 法という評価法が広く用いられている。この *in vitro* 系の評価法を用いて、様々な消毒薬や滅菌剤の毒性も評価されている^{19,20)}。しかし、過酸化水素から生じるヒドロキシルラジカルは生体分子を構成する有機化合物を酸化させる作用が強く、培養液や添加された血清に多く含まれているタンパク質やアミノ酸を酸化、変性させるため²¹⁾、試験物質を培養液に加えるという通常の培養細胞を用いた毒性試験の方法で過酸化水素の毒性を評価すると、細胞培養に用いられる血清や培養液に含まれるタンパク質やアミノ酸などの有機物と過酸化水素から生じたヒドロキシルラジカルが反応して生成された反応生成物が培養細胞に対して影響を及ぼしてしまうことが考えられ、過酸化水素が直接細胞に及ぼす影響を正確に評価できない懸念がある。

細胞毒性を検討したい物質と細胞の培養液に含まれているタンパク質やアミノ酸との相互作用を避けるために、医療機器や医療器具の滅菌剤として用いられている過酢酸製剤とフタラール製剤を、培養液中に添加せず直接細胞へ作用させることで、滅菌剤の細胞に対する直接的な毒性を評価できる直接細胞接触法という方法を竜らが行った²²⁾。この評価方法では、毒性を試験したい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して直接作用するので、消毒薬や滅菌剤など試験物質が培養液中の有機物などと反応して生じた生成物が存在しない状況下で培養細胞に及ぼす直接的な影響を検討することができる利点がある。本研究では、直接細胞接触法を用いて、培養細胞に過酸化水素を直接曝露することで、過酸化水素の培養細胞に対する影響として細胞の生存率を MTT アッセイで評価することで検討した。

過酸化水素を曝露して評価する培養細胞の種類は、毒性評価において広く用いられているヒト由来の細胞株である HeLa 細胞、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法において、滅菌従事者の雄が良し上昇として角膜の異常が多かったことから、動物種はウサギではあるが角膜由来の SIRC 細胞、同じく有害事象として報告の多かった皮膚の異常に対応して、ヒト皮膚の線維芽細胞由来である HDFa 細胞、医療器材の残留によるヒトの組織への使用時に起こる影響を想定し、大腸内視鏡が触れると仮定してヒト結腸がん由来の粘膜上皮細胞である Caco-2 細胞を用いた。これらの

細胞それぞれにおいて、過酸化水素を直接細胞接触法により曝露して細胞の生存を評価し、過酸化水素の培養細胞に対する影響を検討した。

また、竜らは、コラーゲンゲル内に培養細胞を包埋し、試験物質をゲル内に埋め込むことでゲル内の細胞の生存に影響するかを評価するコラーゲンゲル包埋培養法を用いて、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²³⁾。この方法で、板状の形状のみでなく、円柱状など様々な立体的な形状をした物品の表面に付着した消毒薬や滅菌剤をコラーゲンゲル内に包埋された培養細胞に直接接触させることで培養細胞に対する影響を評価することができると考える。本研究では、内視鏡の内筒など医用器材に使われているポリテトラフルオロエチレン (polytetrafluoroethylene (PTFE)) 製のチューブ片を試験片として用い、試験片に付着した過酸化水素を HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に埋め込むことでゲル内の培養細胞に直接接触させ、ゲル内の細胞の生存を評価することで過酸化水素の培養細胞に対する影響を検討した。

目的

本研究は、HeLa 細胞、SIRC 細胞、HDFa 細胞、Caco-2 細胞において直接細胞接触法を行い、培養液中の有機物と過酸化水素や過酸化水素から生じたヒドロキシルラジカルが反応することがないようにして 0.003%から 3%の範囲で過酸化水素を直接培養細胞に曝露して細胞の生存を評価し、過酸化水素が培養細胞に対して直接及ぼす影響について検討した。

また、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞においてコラーゲンゲル包埋培養法を行い、過酸化水素が付着した PTFE チューブ片をゲル内に包埋された培養細胞に接触させてゲル内の細胞の生存を評価し、PTFE チューブ片に付着した過酸化水素が培養細胞に対して及ぼす影響を検討した。

方法

1. 直接細胞接触法

直接細胞接触法には、HeLa 細胞（ヒト子宮頸癌由来細胞株、JRCB 細胞バンク）、SIRC 細胞（ウサギ角膜由来細胞株、JRCB 細胞バンク）、HDFa 細胞（ヒト（成人）皮膚由来線維芽細胞株、Lifeline Cell Technology）、Caco-2 細胞（ヒト結腸癌由来細胞株、DS ファーマバイオメディカル株式会社）の 4 種の細胞を用いた。

各細胞の培養液は、ウシ胎児血清（Fatal bovine serum (FBS)）（Gibco®、Life Technologies）を 10% 添加したダルベッコ変法イーグル培地（Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)、日水製薬株式会社）を用いた。

各細胞を、96 穴マイクロプレート（マルチウェルプレート、Corning）に 1 ウェルあたりの細胞数が 20000 個となるように播種し、CO₂ インキュベーター（BNA-111、Espec）で CO₂ 濃度 5%・37℃の条件下で 24 時間培養し安定化した。

細胞に曝露する過酸化水素は、30%過酸化水素水（過酸化水素水、和光純薬工業 試薬特級）を濃度が 3%、0.6%、0.3%、0.06%、0.03%、0.006%、0.003%となるように蒸留水を超純水製造装置（Simplicity UV、Merck Millipore）で濾過して高圧蒸気滅菌した滅菌水で希釈し作製した。

培養液に含まれる有機物と過酸化水素が接触するのを避けるためと、過酸化水素から酸素ラジカルを生成する反応を触媒する Fe²⁺や Cu²⁺といった金属イオンなどの電解質と過酸化水素と接触することを避けるために、過酸化水素水の希釈は培養液や細胞培養で一般的に用いられるリン酸緩衝生理食塩水（Phosphate buffered saline (PBS)）などの生理食塩水ではなく滅菌水を用いた。

各種の細胞を 96 穴マイクロプレートに播種し安定化させたのち、培養液に含まれる成分を除去するために各ウェル内の培養液を除去し、150μL の PBS（NaCl（関東化学 特級）137mM、Na₂HPO₄（関東化学 特級）8.1mM、KCl（関東化学 特級）2.68mM、KH₂PO₄（関東化学 特級）1.47mM）を静かに加えて除去し再び PBS を加える操作を 3 回繰り返し行った。

洗浄のための PBS を除去し、曝露する各濃度の過酸化水素を各ウェルの細胞に 50μL 添加し、10 分間細胞に直接作用させた。対照群として、過酸化水素の希釈で用いた滅菌水のみをウェル内に 50μL 添加し 10 分間作用させた。事前に、96 穴マイクロプレートのウェル内で培養細胞に過酸化水素の希釈に用いた滅菌水を 10 分間加えても、PBS や 10%FBS を含む DMEM 培地と比較してウェル内の細胞の生存に影響がないことを確認した。また、過酸化水素を十分に細胞に作用させるために、曝露する時間は滅菌水を加えても細胞の生存に影響がなかった 10 分間に設定した。

過酸化水素水を 10 分間作用させたのち、過酸化水素溶液を除去し、各ウェルに PBS を 150μL 加えて取り除き、ウェル内の過酸化水素を洗浄した。そして生細胞を検出するために 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)（Sigma-Aldrich）を 0.5mg/mL となるように溶解した DMEM 培地を各ウェルに 150μL 添加して、5%CO₂・37℃で 2 時間インキュベートした。

直接細胞接触法で HeLa 細胞・SIRC 細胞・HDFa 細胞・Caco-2 細胞に過酸化水素を曝露した

後、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した時の細胞生存率を検討するため、滅菌水で 0.003%・0.006%・0.03%・0.06%・0.3%・0.6%・3%に希釈した過酸化水素を 10 分間細胞に曝露したのち、曝露させた過酸化水素を除去するために 1 ウェルあたり 150 μ L の PBS で 3 回洗浄し、10%FBS を含む DMEM 培地を 1 ウェルあたり 150 μ L ずつ添加して 5%CO₂・37℃で 24 時間培養した。培養後、各ウェルの培養液を 0.5mg/mL の MTT を含む DMEM 培地 150 μ L に交換し 5%CO₂・37℃で 2 時間インキュベートした。

過酸化水素を曝露した直後と曝露して 24 時間培養した後で、各ウェル内で生存した細胞が MTT を取り込み生成したホルマザン色素を抽出するため、各ウェルの MTT 添加 DMEM 培地を除去し、PBS で 3 回洗浄後、イソプロパノール（関東化学）を 150 μ L 加えて室温で 30 分間静置した。

抽出されたホルマザン色素を定量するため、マイクロプレートリーダー（Spectra II、Tecan）を用いて 570nm の吸光度を測定した。

細胞生存率は、（過酸化水素作用後の MTT OD 値） / （過酸化水素未処理の MTT OD 値） $\times$ 100 で算出した。

算出した細胞生存率は、0.003%から 3%までの各濃度間の値で有意差を検討するために *t* 検定を行った。

2. コラーゲングル包埋培養法

コラーゲングル内に包埋する細胞は、HeLa 細胞・SIRC 細胞・Caco-2 細胞の 3 種を用いた。

培養細胞の包埋は、細胞培養用コラーゲン（Cellmatrix® I -A、新田ゼラチン株式会社）を用いた。培養器として 12 穴のパーミアブルサポート（Transwell®、Corning Cat.No.3402）を用いた。パーミアブルサポートを用いたゲル包埋培養法の模式図を図 1 に示す。

氷冷しながら、滅菌操作で Cellmatrix® I -A を 8 容量、NaHCO₃を添加していない 10 倍濃度の DMEM 培地を 1 容量、コラーゲンを中性化してゲル化させるための緩衝液（NaHCO₃（和光純薬工業 試薬特級）2.2%、4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid（HEPES）（同仁化学研究所）200mM、NaOH（和光純薬工業）5mM）を 1 容量混和した。このコラーゲン溶液に、パーミアブルサポートのインサート 1 個あたり細胞数が 50000 個となるように DMEM 培地で調整した HeLa 細胞・SIRC 細胞・Caco-2 細胞の細胞懸濁液を 100 μ L 加え混和した。

各細胞を含むコラーゲン溶液をパーミアブルサポートのインサート内に 0.75mL ずつ分注し、5%CO₂・37℃インキュベーター内で 30 分間静置しコラーゲンをゲル化させた。

コラーゲンがゲル化したことを確認して、インサートが挿入されているウェル内に 10%FBS を含む DMEM 培地を 1.5mL 加え、5%CO₂・37℃で 48 時間培養し、コラーゲングル内に包埋された細胞を安定化した。

各細胞が包埋されたコラーゲングル内に埋め込む試験材料は、外径 3mm、内径 1mm のポリテトラフルオロエチレン（polytetrafluoroethylene（PTFE））チューブ（チューコフロー®PTFE チューブ、中興化成工業株式会社・製造番号 13H0204）を 5mm の長さに切断し、中性洗剤で十分に洗浄後、高圧蒸気滅菌で滅菌したものをを用いた。滅菌した PTFE チューブの実験操作はクリーンベンチ内で無菌的に行った。コラーゲングル内に埋め込む PTFE チューブ片の処理は、3%

過酸化水素水に 10 分間浸漬し引き上げ、滅菌ガーゼで過酸化水素水の水滴を除去し風乾しない PTFE チューブ片と、3%過酸化水素に 10 分間浸漬し引き上げたのち滅菌ガーゼで過酸化水素の水滴を除去した後 30 分間風乾した PTFE チューブ片とした。

パーミアブルサポートのインサート内の各細胞が包埋されたコラーゲングル内に、過酸化水素処理をした PTFE チューブ片を垂直に挿入し埋没させた。対照群として、高圧蒸気滅菌後 3%過酸化水素水で処理をしなかった PTFE チューブ片をゲル内に埋没させた。PTFE チューブ片をゲル内に埋没させたゲルを 5%CO₂・37℃インキュベーターで 24 時間培養した。

コラーゲングル内に埋め込まれた PTFE チューブ片に付着した過酸化水素とコラーゲングル内に透徹した 10%FBS を含む DMEM 培地が接触しない条件でコラーゲングル包埋培養法を行うために、試験片を埋め込む前に、パーミアブルサポートの各ウェル内の 10%FBS を含む DMEM 培地を FBS を添加しない DMEM 培地に交換し 5%CO₂・37℃で 1 時間インキュベーションし、コラーゲングル内に透徹している培養液を FBS を含まない DMEM 培地に置換した。ゲル内に浸透した培養液を FBS を含まない DMEM 培地に置換したのち、対照群である過酸化水素処理を施さなかった PTFE チューブ片および過酸化水素処理を施した PTFE チューブをゲル内に埋め込み、5%CO₂・37℃インキュベーター内で 24 時間培養した。

コラーゲングル内の生存していた細胞を検出するために各ウェル内の培養液を 0.5mg/mL の MTT を含む DMEM 培地と交換し、5%CO₂・37℃で 2 時間インキュベートした。

生存していた細胞が MTT を取り込んで生成した青色のホルマジン色素を観察しやすくするため、各ウェル内の MTT 添加培地を除去し、各ウェル内に PBS を 1.5mL 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、コラーゲングル内の MTT 添加培地を除去し、写真撮影を行った。

過酸化水素水で処理した PTFE チューブ片による細胞生存率への影響を検討するため、イソプロパノールを各ウェル内に 1.5mL、インサート内のコラーゲングル上に 0.5mL 加えて室温で 30 分間静置し、コラーゲングル内の生細胞が MTT を取り込んで生成したホルマジン色素を抽出した。各ウェル内の抽出されたホルマジン色素溶液を 150μL ずつ 96 穴マイクロプレートに移し、マイクロプレートリーダーを用いて波長 570nm の吸光度を測定した。

得られた吸光度から細胞の生存率を算出した。細胞生存率は、(過酸化水素で処理したチューブ片を埋没させたゲルの MTT OD 値) / (過酸化水素で処理を行わなかった滅菌チューブ片を埋没させたゲルの MTT OD 値) ×100 で算出した。

算出した細胞生存率は、3%過酸化水素水で 10 分間浸漬したのち風乾せずに細胞が包埋されたゲル内に埋め込まれたときと、30 分間風乾して細胞が包埋されたゲル内に埋め込んだときの間に有意差を検討するために *t* 検定を行った。

結果

1. 直接細胞接触法の結果

1-1. HeLa 細胞

HeLa 細胞において直接細胞接触法により過酸化水素を曝露して MTT アッセイにより得られた吸光度を表 1 に、吸光度から算出した細胞生存率を図 2 に示す。

過酸化水素を曝露した直後では、control 群である滅菌水のみを曝露した群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.03% までの群の吸光度の間では有意差はなかったが、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.06% 以上の群の吸光度の間では有意差が見られた ($p<0.05$)。過酸化水素を曝露した直後の HeLa 細胞の細胞生存率では、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% の間は曝露した過酸化水素の濃度が上昇するに従い 90% から 63% になったが、この濃度間における細胞生存率には有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.3% では細胞生存率は 32% になっており、過酸化水素濃度 0.06% における細胞生存率と過酸化水素濃度 0.3% における細胞生存率に有意差があった ($p<0.01$)。曝露した過酸化水素濃度が 0.6% では細胞生存率は 19% で、過酸化水素濃度が 3% になると細胞生存率は 9% になっていたが、過酸化水素濃度が 0.3% から 3% の間における細胞生存率には有意差はなかった。

直接細胞接触法で過酸化水素を曝露したのち、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養したのちに MTT アッセイを行って得られた吸光度では、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.3% までの群との間では有意差はなかったが、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.6% 以上の群との間では有意差が見られた ($p<0.05$)。直接細胞接触法により過酸化水素を曝露して 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率は、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% の間で 97% から 78% になったが、この濃度間における細胞生存率には有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.06% から 0.3% に上昇すると、細胞生存率は 78% から 24% になり、過酸化水素濃度 0.06% における細胞生存率と過酸化水素濃度 0.3% における細胞生存率には有意差があった ($p<0.05$)。曝露した過酸化水素濃度が 0.6% になると細胞生存率は 4% となり、過酸化水素濃度が 0.3% における細胞生存率である 24% との間には有意差があった ($p<0.01$)。過酸化水素濃度 3% においては細胞生存率は 1% 弱となり、過酸化水素濃度 0.6% における細胞生存率と有意差があった ($p<0.05$)。

1-2. SIRC 細胞

ウサギ角膜由来の細胞株である SIRC 細胞において、直接細胞接触法により過酸化水素を曝露し MTT アッセイで得られた吸光度を表 2、吸光度より細胞生存率を求めた結果を図 3 に示す。

過酸化水素を曝露した直後では、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% までの群との間に有意差はなかったが、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.3% から 3% の群との間に有意差があった ($p<0.05$)。過酸化水素を曝露した直後の SIRC 細胞の生存率は、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% までの間で 87% から 77% になった。この濃度の区間では、細胞生存率の変化には有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.06% から 0.3% に上昇すると、細胞生存率は 77% から 46% になり、この濃度間の細胞生存率には有意差があった ($p<0.01$)。

曝露した過酸化水素濃度が 0.6% のとき細胞生存率は 28%、過酸化水素濃度が 3% のとき細胞生存率は 10% となった。この区間における細胞生存率には有意差はなかった。

直接細胞接触法により過酸化水素を曝露後、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後に求めた吸光度では、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% までの間では有意差はなかったが、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.3% から 3% では有意差があった ($p<0.05$)。直接細胞接触法により過酸化水素を曝露後、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率は、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% では 93%、過酸化水素濃度が 0.006% では 85%、過酸化水素濃度が 0.03% では 82%、過酸化水素濃度が 0.06% では 75% となったが、この濃度区間における細胞生存率は有意差がなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.06% から 0.3% になると、細胞生存率は 75% から 9% となり、この濃度間の細胞生存率には有意差があった ($p<0.05$)。曝露した過酸化水素濃度が 0.6% に上昇すると細胞生存率は 3% となり、過酸化水素濃度が 0.3% のときの細胞生存率 9% と比較すると有意差があった ($p<0.01$)。さらに、曝露した過酸化水素濃度が 3% での細胞生存率は 1% であり、過酸化水素濃度 0.6% における細胞生存率との間に有意差があった ($p<0.05$)。

1-3. HDFa 細胞

ヒトの皮膚組織由来の線維芽細胞株である HDFa 細胞において、直接細胞接触法により過酸化水素を曝露し MTT アッセイを行って得られた吸光度を表 3 に、吸光度より細胞生存率を求めた結果を図 4 に示す。

過酸化水素を曝露した直後の MTT アッセイの結果、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.03% までの吸光度では有意差はなかったが、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.06% から 3% までの吸光度では有意差があった ($p<0.05$)。HDFa 細胞において過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率は、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% では 83%、過酸化水素濃度が 0.006% では 81% であり、この間における細胞生存率の変化に有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.03% になると細胞生存率は 65% となり、過酸化水素濃度が 0.06% になると細胞生存率は 49% となったが、この間では細胞生存率の変化に有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.3% のとき細胞生存率は 19% であり、過酸化水素濃度が 0.06% の細胞生存率である 49% と比較すると有意差があった ($p<0.01$)。曝露した過酸化水素濃度が 0.6% のとき細胞生存率は 12%、過酸化水素濃度が 3% のとき細胞生存率は 7% になったが、この濃度間では細胞生存率に有意差はなかった。

直接細胞接触法で過酸化水素を曝露したのち、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養して MTT アッセイを行うと、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.03% までの間の吸光度とは有意差はなかったが、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.06% から 3% の吸光度との間には有意差があった ($p<0.05$)。過酸化水素曝露後 10%FBS を含む培地で 24 時間培養した後の細胞生存率は、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.03% の間では 81% から 61% になった。この濃度間における細胞生存率には有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.06% になると細胞生存率は 30% となり、過酸化水素濃度が 0.03% における細胞生存率である 61% と比較すると有意差があった ($p<0.05$)。さらに、過酸化水素濃度が 0.3%

での細胞生存率は 7% となり、過酸化水素濃度 0.06% の細胞生存率である 30% と比較すると有意差があった ($p<0.05$)。曝露した過酸化水素濃度が 0.6% では細胞生存率は 6%、過酸化水素濃度が 3% では細胞生存率は 5% であり、この濃度間の細胞生存率には有意差はなかった。

1-4. Caco-2 細胞

ヒト結腸癌由来の細胞株である Caco-2 細胞において、直接細胞接触法により過酸化水素を曝露して MTT アッセイで得られた吸光度を表 4、吸光度より細胞生存率を求めた結果を図 5 に示す。

過酸化水素を曝露した直後では、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% までの吸光度の間では有意差はなかったが、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.3% から 3% までの吸光度とは有意差があった ($p<0.05$)。過酸化水素曝露直後の Caco-2 細胞の生存率は、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% では 78%、過酸化水素濃度が 0.006% では 77% であり、この間に有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.03% になると細胞生存率は 70%、過酸化水素濃度が 0.06% になると細胞生存率は 66% となり、この間の変化にも有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.3% になると細胞生存率は 15% となり、過酸化水素濃度が 0.06% のときの細胞生存率である 66% と比較すると有意差があった ($p<0.01$)。さらに、過酸化水素濃度が 0.6% になると細胞生存率は 2% となり、過酸化水素濃度 0.3% における細胞生存率である 15% と比較すると有意差があった ($p<0.05$)。過酸化水素濃度が 3% になると細胞生存率は 3% となり、過酸化水素濃度が 0.6% の細胞生存率とは有意差はなかった。

直接細胞接触法によって過酸化水素を曝露したのち、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後に MTT アッセイを行った結果、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 3% までのすべての濃度系列における吸光度との間で有意差が見られた ($p<0.05$)。曝露後 24 時間通常培地で培養したときの Caco-2 細胞の生存率は、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% で 58%、過酸化水素濃度が 0.006% では 62% で、両者間に有意差はなかった。曝露した過酸化水素濃度が 0.03% のときの細胞生存率は 27% となり、過酸化水素濃度が 0.006% のときの細胞生存率である 62% と比較すると有意差があった ($p<0.05$)。曝露した過酸化水素濃度が 0.06% で細胞生存率は 16%、過酸化水素濃度が 0.3% で細胞生存率は 17% であり、この濃度間の細胞生存率は有意な変化はなかった。過酸化水素濃度が 0.6% では細胞生存率は 3% となり、過酸化水素濃度 0.3% の細胞生存率である 17% よりも有意に変化していた ($p<0.05$)。曝露した過酸化水素の濃度が 3% では細胞生存率は 2% であり、過酸化水素濃度が 0.6% のときの細胞生存率である 3% より有意な変化はなかった。

2. コラーゲンゲル包埋培養法の結果

2-1. PTFE チューブ片を埋め込んだ後、10%FBS を含む培養液で培養した結果

2-1-1. 3%過酸化水素水に浸漬しなかった PTFE チューブ片

滅菌した PTFE チューブ片を、3%過酸化水素水で処理をせずに細胞を包埋したコラーゲンゲル内に埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養したのちに生細胞に MTT を取り込ませてホルマザン色素で発色した結果を図 6 に示す。

図 6a は、HeLa 細胞を含むコラーゲンゲルを示す。ホルマザン色素により青紫色の発色がコラ

ーゲンゲル内に一様に存在した。コラーゲンゲル内に埋め込んだ PTFE チューブ片の周囲を拡大した写真を図 6b に示す。ゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲にも、ホルマザン色素による発色が見られた。

図 6c は SIRC 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に過酸化水素で処理をしなかった滅菌 PTFE チューブ片を埋め込んだ結果を示す。HeLa 細胞での結果と同様に、ゲル内に均一にホルマザン色素による発色が見られた。図 6d はコラーゲンゲル内に埋め込んだ PTFE チューブ片の周囲を拡大した像を示す。埋め込んだ PTFE チューブ片が接触しているゲル内にもホルマザン色素による発色が見られた。

図 6e は Caco-2 細胞における結果を示す。Caco-2 細胞も HeLa 細胞や SIRC 細胞と同様にゲル内に均一にホルマザン色素による発色が見られた。図 6f は埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲を拡大した像を示す。埋め込まれた PTFE チューブ片が接触していたゲルの部分にもホルマザン色素による発色が見られた。

2-1-2. 3%過酸化水素水に浸漬後、風乾しなかった PTFE チューブ片

細胞を包埋したコラーゲンゲル内に、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬したあと風乾せずに埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養したのち MTT を生細胞に取り込ませてホルマザン色素で発色させた結果を図 7 に示す。

図 7a は、HeLa 細胞を包埋したコラーゲンゲルの結果を示す。ホルマザン色素による青紫色の発色がコラーゲンゲル内に一様に存在していたが、3%過酸化水素水で 10 分間処理した PTFE チューブ片の周囲のコラーゲンゲルでは、ホルマザン色素による青紫色の発色が薄くなっている領域が形成されていた。図 7b はコラーゲンゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片周囲の拡大像を示す。PTFE チューブ片がコラーゲンゲルと接触している部分では、ホルマザン色素による発色が見られなくなっていた。

図 7c は SIRC 細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に 3%過酸化水素水で処理した PTFE チューブ片を風乾せずに埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した結果を示す。埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲において、ホルマザン色素による発色が薄くなっていることがわかった。図 7d は SIRC 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に埋め込んだ PTFE チューブ片を拡大した像を示す。処理後の PTFE チューブ片がゲルと接触している部分はホルマザン色素による発色が見られなかった。

図 7e は Caco-2 細胞を包埋したコラーゲンゲルでの結果を示す。HeLa 細胞や SIRC 細胞での結果と同様に、埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲のみがホルマザン色素による発色が薄くなっていた。ゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の部分を拡大した像を図 7f に示す。埋め込まれた PTFE チューブ片がコラーゲンゲルと接触している部分ではホルマザン色素による発色がほとんど見られなかった。

2-1-3. 3%過酸化水素水に浸漬後、30 分間風乾した PTFE チューブ片

細胞を包埋したコラーゲンゲル内に、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬したあとクリーンベンチ内で 30 分間風乾して埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24

時間培養した後 MTT を生細胞に取り込ませてホルマザン色素で発色させた結果を図 8 に示す。

図 8a は HeLa 細胞を包埋したコラーゲンゲルの結果を示す。ホルマザン色素による青紫色の発色がコラーゲンゲル内に一様に存在し、コラーゲンゲル内に埋め込まれた処理後の PTFE チューブ片の周囲も一様にホルマザン色素による発色が見られた。ゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片周囲の拡大像を図 8b に示す。埋め込まれた PTFE チューブ片がコラーゲンゲルと接触していた部分にもホルマザン色素による発色が見られた。

図 8c は SIRC 細胞が包埋されたコラーゲンゲルの結果を示す。HeLa 細胞での結果と同様、コラーゲンゲル内に一様にホルマザン色素で発色がみられ、埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲にもホルマザン色素による発色が見られた。埋め込まれた PTFE チューブ片の部分を拡大した像を図 8d に示す。埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲やコラーゲンゲルと接触している部分でもホルマザン色素の発色が見られた。

図 8e は Caco-2 細胞が包埋されたコラーゲンゲルの結果を示す。HeLa 細胞や SIRC 細胞の結果と同様に、埋め込んだ PTFE チューブ片の周辺を含めて、コラーゲンゲル内に一様にホルマザン色素による発色が見られた。埋め込まれた PTFE チューブ片の部分を拡大した像を図 8f に示す。埋め込まれた PTFE チューブ片がコラーゲンゲルと接触する部分やその周囲の領域にもホルマザン色素による発色が見られた。

2-2. PTFE チューブ片を埋め込んだ後、血清を含まない培養液で培養した結果

3%過酸化水素水で処理をした PTFE チューブ片と、コラーゲンゲル内に透徹している培養液中の血清との反応を除くために、細胞を包埋したコラーゲンゲル内に PTFE チューブ片を埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養して生細胞を検出した。

2-2-1 3%過酸化水素水に浸漬しなかった PTFE チューブ片

滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に浸漬せずに細胞が包埋されたコラーゲンゲルに埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養した結果を図 9 に示す。

HeLa 細胞は図 9a、SIRC 細胞は図 9c、Caco-2 細胞は図 9e に示す。いずれの細胞でも、ゲル内に均一にホルマザン色素による発色が見られた。埋め込まれた PTFE チューブ片がゲルと接触している部分でも、図 9b に示した HeLa 細胞、図 9d に示した SIRC 細胞、図 9f に示した Caco-2 細胞のいずれの細胞においても、ホルマザン色素による発色が見られた。

2-2-2. 3%過酸化水素水に浸漬後、風乾しなかった PTFE チューブ片

滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬して風乾せずに細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に埋め込み、無血清培地で 24 時間培養したのち生存した細胞を MTT で検出した結果を図 10 に示す。

図 10a は、HeLa 細胞を包埋したコラーゲンゲルの結果を示す。コラーゲンゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲にもホルマザン色素による発色が見られた。図 10b は、埋め込まれた PTFE チューブ片の拡大像を示す。ゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片がゲルと接触している部分でもホルマザン色素による発色が見られた。

図 10c は、SIRC 細胞を包埋したにコラーゲングル内に埋め込んだ結果を示す。3%過酸化水素水による処理を施した PTFE チューブ片の周囲のゲルでは、ホルマザン色素による発色がほとんど見られなくなっていた。SIRC 細胞を包埋したコラーゲングル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲を拡大した像を図 13d に示す。SIRC 細胞において 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養したときの結果を示す図 7c・d と同様に、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養したときも、PTFE チューブ片がコラーゲングルと接触している部分はホルマザン色素による発色は見られなかった。

図 10e は、Caco-2 細胞を包埋したコラーゲングルにおける結果を示す。PTFE チューブ片が埋め込まれている周囲のコラーゲングルでは、ホルマザン色素による発色が薄い部分が生じていた。図 7e に示した Caco-2 細胞において 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した結果と比較すると、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養すると PTFE チューブ片の周囲でもホルマザン色素による発色が若干見られた。Caco-2 細胞を包埋したコラーゲングル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の部分を拡大した像を図 13f に示す。埋め込まれた PTFE チューブとコラーゲングルが接触していた部分とその周辺でもホルマザン色素による発色が見られた。

図 10 に示した結果から、滅菌した PTFE チューブを 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し、風乾させずに直ちにコラーゲングル内に埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養すると、SIRC 細胞では処理した PTFE チューブに接触する部分や近傍のコラーゲングルではホルマザン色素による発色はほぼ見られず、Caco2 細胞では 10%FBS を含む培地で 24 時間培養した結果よりもホルマザン色素による発色は弱かったものの、PTFE チューブ片の周辺や接触していたゲルにはホルマザン色素による発色は見られ、HeLa 細胞では、図 6a と図 6b に示した 3%過酸化水素水に浸漬しなかった PTFE チューブ片を埋め込んだ場合と同様にゲル全体にホルマザン色素による発色が見られた。

2-2-3. 3%過酸化水素水に浸漬後、風乾した PTFE チューブ片

滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し、クリーンベンチ内で 30 分間風乾した後に細胞が包埋されたコラーゲングル内に埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養して生細胞を検出した結果を図 11 に示す。

図 11a は HeLa 細胞を包埋したコラーゲングルにおける結果を示す。埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲に関わらずコラーゲングル内に一様にホルマザン色素による発色が見られた。HeLa 細胞を包埋したコラーゲングルに埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲を拡大した像を図 11b に示す。処理後の PTFE チューブの周囲や、PTFE チューブ片と接触しているコラーゲングル内にホルマザン色素による発色が見られた。

図 11c は SIRC 細胞が包埋されたコラーゲングル内に過酸化水素で処理をした PTFE チューブ片を埋め込んだときの結果を示す。コラーゲングル内に一様にホルマザン色素による発色が見られ、処理を施した PTFE チューブ片の周囲にも同様に均一にホルマザン色素による発色が見られた。SIRC 細胞を包埋したコラーゲングル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の部分を拡大した像を図 11d に示す。埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲やコラーゲングルと接触している部分でもホルマザン色素の発色が見られた。

図 11e に、Caco-2 細胞を包埋したコラーゲングル内に 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬した後 30 分間風乾させた PTFE チューブ片を埋め込んだ結果を示す。PTFE チューブ片がコラーゲングルに接触している部分やその近傍の領域でもホルマザン色素による発色が見られた。Caco-2 細胞を包埋したコラーゲングル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の部分を拡大した像を図 11f に示す。埋め込まれた PTFE チューブに接触している部分やその近傍の領域でもホルマザン色素による発色が一様に見られた。

図 11 に示した結果から、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し 30 分間風乾すると、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞のいずれの細胞においても PTFE チューブ片に接触した部分や近傍のコラーゲングルにホルマザン色素による発色が見られた。

2-3. コラーゲングル包埋培養法における MTT アッセイおよび細胞生存率

2-3-1. HeLa 細胞

コラーゲングル内に包埋された HeLa 細胞に MTT を取り込ませることで生成されたホルマザン色素を、イソプロパノールで抽出して吸光度を測定した結果を表 5、細胞生存率を算出した結果を図 12 に示す。表 5 および図 12 で、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し、風乾せずに直ちにゲル内に埋め込んだ群を 0 分群 (0min)、30 分間風乾してゲル内に埋め込んだ群を 30 分群 (30min) とし、また、試験片をコラーゲングル内に埋め込んだのち 10% FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した群を「FBS(+)」(n=18)、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養した群を「FBS(-)」(n=12) で示した。

FBS(+)では、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に浸漬しなかった control 群の吸光度と、0 分群および 30 分群のそれぞれの吸光度との間に有意差はなかった。また、0 分群の細胞生存率は 83%、30 分群の細胞生存率は 106%で、0 分群の細胞生存率と 30 分群の細胞生存率の間に有意差があった ($p<0.05$)。

FBS(-)では、control 群の吸光度と 0 分群および 30 分群それぞれの吸光度の間に有意差はなかった。細胞生存率は、0 分群では 89%で 30 分群では 96%となり、両者間で有意差はなかった。

2-1-5. SIRC 細胞

SIRC 細胞をコラーゲングル内に包埋し、各種の処理を施した PTFE チューブ片を埋め込んで 24 時間培養したのちに MTT を生存細胞に取り込ませて生成されたホルマザン色素をイソプロパノールで抽出し、吸光度を測定した結果を表 6、吸光度より算出した細胞生存率を図 10 に示す。表 6 および図 10 で、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し、風乾せずに直ちにゲル内に埋め込んだ群を 0 分群 (0min)、30 分間風乾してゲル内に埋め込んだ群を 30 分群 (30min) とし、また、試験片をコラーゲングル内に埋め込んだのちに 10%FBS を含む培地で 24 時間培養した群を「FBS(+)」(n=18)、FBS を含まない培地で 24 時間培養した群を「FBS(-)」(n=9) で示した。

FBS(+)では、3%過酸化水素水に浸漬しなかった滅菌 PTFE チューブ片を埋め込んだ control 群の吸光度と、0 分群および 30 分群のそれぞれの吸光度との間に有意差はなかった。細胞生存率は、0 分群では 62%、30 分群では 118%であり、0 分群の細胞生存率と 30 分群の細胞生存率の

間では有意差があった ($p<0.01$)。

FBS(-)では、control 群の吸光度と 0 分群および 30 分群それぞれの吸光度の間に有意差はなかった。細胞生存率は、0 分群は 80%で 30 分群は 119%であり、0 分群の細胞生存率と 30 分群の細胞生存率の間では有意差があった ($p<0.05$)。

2-1-6. Caco-2 細胞

Caco-2 細胞を包埋したコラーゲングル内に試験片を埋め込み、24 時間培養したのちに MTT を取り込ませて生成されたホルマザン色素をイソプロパノールで抽出し、吸光度を測定した結果を表 7、吸光度から求めた細胞生存率を図 14 に示す。表 7 および図 14 で、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し、風乾せずに直ちにゲル内に埋め込んだ群を 0 分群 (0min)、30 分間風乾してゲル内に埋め込んだ群を 30 分群 (30min) とし、また、試験片をコラーゲングル内に埋め込んだのちに 10%FBS を含む培地で 24 時間培養した群を「FBS(+)」($n=18$)、FBS を含まない培地で 24 時間培養した群を「FBS(-)」($n=9$) で示した。

FBS(+)では、滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に浸漬せずゲル内に埋め込んだ control 群の吸光度と、0 分群および 30 分群それぞれの吸光度との間に有意差はなかった。0 分群の細胞生存率は 80%であり、30 分群の細胞生存率は 119%であった。0 分群と 30 分群の細胞生存率の間では有意差があった ($p<0.05$)。

FBS(-)では、control 群の吸光度と 0 分群の吸光度の間では有意差があった ($p<0.045$) が、control 群と 30 分群の吸光度の間には有意差はなかった。細胞生存率は、0 分群は 91%で 30 分群は 113%となり、両者間では有意差はなかった。

考察

通常の培養細胞を用いた毒性試験では、細胞を培養器に播種して安定化させて評価したい試験物質を培養液に添加して細胞に曝露し、MTTを含む培養液と交換して試験物質の曝露後に生存した細胞でホルマザン色素を生成させて細胞の生存を評価する方法が行われているが¹⁷⁾、本研究で用いた細胞直接接触法は試験物質を培養液に添加しない方法である。この方法は、試験物質が血清や培養液中の有機物と接触しないため、試験物質と培養液中の物質が反応して生じた生成物による細胞への作用を排除して試験物質が細胞に直接どのように影響するのかを評価することができる²²⁾。

本研究で培養細胞に曝露した過酸化水素は酸化作用の強いヒドロキシルラジカルを生成し、 Fe^{2+} や Cu^{2+} といった還元型金属イオンの存在下ではヒドロキシルラジカルの生成が促進される可能性がある²⁾。過酸化水素を多くの有機化合物やイオン類を含む培養液に添加した場合、過酸化水素からヒドロキシルラジカルが生成する可能性があり、生じたヒドロキシルラジカルは培養液に含まれる有機化合物を酸化してしまう可能性がある。培養液中の物質が酸化されて生じた生成物によって、培養細胞に影響が及ぼされてしまうことが懸念され、過酸化水素が直接培養細胞にどのように作用するのかを検討するためには、過酸化水素を培養液に添加せず直接細胞に曝露できる直接細胞接触法が有用であると考ええる。

HeLa 細胞に対して直接細胞接触法で過酸化水素を 0.003%から 3%の範囲で曝露し、直ちに MTT を生存した細胞に取り込ませて細胞生存率を求めると、図 2 に示した通り過酸化水素の濃度が 0.06%から 0.3%に上昇する間で細胞生存率が 50%以下に低下した。

Singh らは、HeLa 細胞に対して 125 μM の過酸化水素を 15 分間、1 時間、3 時間作用させたとき 15 分間では 7%、3 時間では 40%の細胞がアポトーシスを起こしていることを報告している²⁴⁾。本研究では図 2 に示した通り、過酸化水素曝露直後の細胞生存率は過酸化水素濃度が 0.06% (17.6mM) から 0.3% (88.2mM) の間で 65%から 32%に減少しており、0.003% (882 μM) の過酸化水素濃度でも細胞生存率は 86%で 14%の細胞は死滅したことを示しており、過酸化水素が HeLa 細胞に作用してアポトーシスを起こすことで細胞の死滅を起こしたと考える。

Pallepati らは、HeLa 細胞に作用させる過酸化水素の濃度を 0~50 μM に増加するとアポトーシスが起る細胞が 40%に増加したことを報告している²⁵⁾。図 2 より、曝露する過酸化水素の濃度が上昇すると細胞生存率は徐々に低下しており、HeLa 細胞では、作用させる過酸化水素の濃度が上昇するに従って影響を受けて死滅する細胞数は増加する性質を持つ細胞であると考ええる。

図 2 で示した HeLa 細胞に対して直接細胞接触法で過酸化水素曝露後 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養したときの細胞生存率は、過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率と同様に過酸化水素の濃度が 0.06%から 0.3%に上昇する部分で細胞生存率が 50%以下に低下していた。作用させた過酸化水素濃度が 0.6%のときは、作用後ただちに細胞生存率を求めると 19%であり、24 時間培養後では 4%に低下していた。さらに、作用させた過酸化水素濃度が 3%のとき、作用直後に細胞生存率を求めると 10%であり、24 時間培養後に細胞生存率を求めると 1%に低下していた。Singh らは、HeLa 細胞に対して 125 μM の過酸化水素を 15 分間、1 時間、3 時間作用さ

せると、作用時間が長くなるほどミトコンドリアにあるアポトーシスを引き起こすカスパーゼの活性が上昇したことを報告しており²⁴⁾、また、Higuch らは HeLa 細胞に 3mM の過酸化水素を 30 分間作用させるとミトコンドリア DNA の断片化が起こることを報告している²⁶⁾。HeLa 細胞では、過酸化水素が細胞に直接作用するとミトコンドリアなどの細胞内小器官に酵素タンパク質や DNA に変化が生じ、それが細胞を死滅に導く障害となることもありうると考える。よって、過酸化水素による HeLa 細胞に対する死滅させる作用は、過酸化水素を細胞に作用させた直後に生じる急性のものと、24 時間培養の間で徐々に生じるものがあることが考えられる。

SIRC 細胞の直接細胞接触法では、図 3 に示す通り SIRC 細胞において作用させた過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% の間では、細胞生存率が減少する幅が小さく、0.006% から 0.06% の間では細胞生存率の低下は 5% 以内の範囲であった。Pan らは、角膜上皮細胞に対し 10~50 μ M の範囲で過酸化水素を作用させると、細胞の増殖や細胞間接着が促進されることを報告しており²⁷⁾、本研究の結果でも、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% の範囲では細胞生存率あまり減少しなかったと考える。

図 3 に示したように曝露した過酸化水素濃度が 0.3% から 3% の間では濃度依存的に細胞生存率が減少する傾向が見られた。Joyce らは、ヒト由来の角膜上皮細胞に対して 0~100 μ M の範囲で過酸化水素を 4 時間作用させると濃度依存的に DNA の損傷が増加し、500 μ M 以上になると細胞死が確認されたことを報告しており²⁸⁾、本研究でも SIRC 細胞では曝露した過酸化水素濃度が 0.3% 以上になると濃度依存的に細胞の死滅が増加して細胞生存率が減少したと考える。

過酸化水素を作用させた直後に細胞生存率を求めると、図 3 に示した通り、過酸化水素濃度が 0.06% から 0.3% の間で細胞生存率が 50% よりも低くなった。また、SIRC 細胞では、作用させた過酸化水素濃度が 0.3%、0.6% および 3% のとき、過酸化水素を作用させた直後の細胞生存率よりも過酸化水素を作用させて 10% FBS を含む培養液で 24 時間培養した後の細胞生存率が大きく減少していた。Tripathi らは、ヒト由来の角膜上皮細胞において 0.007~0.01% の過酸化水素を作用させると数分以内に細胞死が引き起こされたことを⁵⁾、Konynenbelt らは 0.01% の過酸化水素を含むコンタクトレンズの洗浄液を培養したヒト由来の角膜上皮細胞に対して作用させると、生存した細胞数は若干減少した程度であったが、作用させた過酸化水素濃度を 0.1% よりも高くすると細胞生存率が低下することを報告している⁶⁾。SIRC 細胞に関しては、HeLa 細胞と同様に高い濃度の過酸化水素が作用すると、24 時間通常の培地で培養しても細胞生存率の減少を引き起こしたのと考えられる。

図 4 に示した通り、HDFa 細胞において直接細胞接触法で過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率は過酸化水素濃度が 0.006% から 3% の間で濃度依存的に低下し、特に過酸化水素濃度が 0.06% から 0.3% の間で有意に細胞生存率が低下した。この傾向は HeLa 細胞で見られた傾向と同様であった。ヒト皮膚の線維芽細胞において、500 μ M の過酸化水素を 5 分間作用させると細胞生存率は 80% で、800mM の過酸化水素を 5 分間作用させると細胞生存率は 40% に低下したことから²⁹⁾、HDFa 細胞では曝露する過酸化水素の濃度依存的に細胞の死滅が引き起こされる性質の細胞であると考えられる。

HDFa 細胞において直接細胞接触法で過酸化水素を作用させたあと 24 時間培養した後の細胞生存率も、過酸化水素作用後ただちに細胞生存率を求めた結果とほぼ同じ結果であり、10 分間の過酸化水素曝露後に通常の 10%FBS を含む培養液で 24 時間培養しても、曝露された過酸化水素の作用は HDFa 細胞に残ってしまい、24 時間培養している間に細胞が死滅し、細胞生存率の低下となったと考える。

ヒト結腸粘膜上皮細胞由来の Caco-2 細胞で直接細胞接触法を用いて過酸化水素を作用させた直後では、図 5 に示した通り過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% の間で細胞生存率は約 12% 低下し、作用させた過酸化水素濃度が 0.06% から 0.3% になると細胞生存率は約 50% の低下が見られた。Wijeratne らは、Caco-2 細胞に対して過酸化水素濃度 50~250 μ M の範囲で 30 分間作用させると、作用させた過酸化水素濃度が 50~250 μ M の範囲では Caco-2 細胞内のカタラーゼ活性は残存し、250 μ M になると細胞生存率は 5% 未満になったことを報告している³⁰⁾。本研究の結果で、作用させる過酸化水素濃度が 0.003%~0.06% の間で細胞生存率に大きな低下が見られなかったのは、Caco-2 細胞が持つカタラーゼ活性のために過酸化水素が分解され細胞を死滅させる作用が弱かったためであり、曝露した過酸化水素濃度が 0.3% 以上になると Caco-2 細胞がもつカタラーゼ活性では過酸化水素を十分に分解することができずに細胞の死滅に至ったと考える。

図 5 に示した Caco-2 細胞に対して直接細胞接触法で過酸化水素を曝露し 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養したのちの細胞生存率は、過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率よりも全ての過酸化水素濃度において低下していた。Caco-2 細胞では、過酸化水素を 0~250 μ M の範囲で 3 時間作用させると、150 μ M よりも高い濃度で DNA の損傷が増加することが報告されており³⁰⁾、また、Caco-2 細胞を単層で培養した条件下で 5~50 μ M の過酸化水素を作用させると、濃度依存的に細胞間を分子が通り抜ける細胞透過性が増加するが、作用させる過酸化水素濃度が 100~500 μ M の範囲では細胞透過性が減少してしまうことが報告されており³¹⁾、Caco-2 細胞では過酸化水素曝露により細胞内での変化や細胞間結合や細胞膜の変化も引き起こされており、そのために曝露直後では死滅に至らない過酸化水素の濃度であっても、曝露後に通常の培養液で培養している間に細胞が死滅してしまう可能性があると考ええる。

過酸化水素で滅菌を行った際、滅菌物の表面に過酸化水素が残留していることを想定し、過酸化水素で処理を行った試験片を各種の培養細胞を包埋したコラーゲングル内に埋め込み、コラーゲングル内で生存した細胞を検出して細胞生存率を求めた。直接細胞接触法で用いた HDFa 細胞はヒト皮膚由来の線維芽細胞であり、細胞外基質を形成するためコラーゲンを線維化させる作用を有するため、本研究で用いたコラーゲングル包埋には不適切であると考え、行っていない。

試験片として、液体クロマトグラフィーなどで用いられる高品質の PTFE チューブを用いた。PTFE チューブはカテーテルや各種の内視鏡で送気・送水ノズルの内筒として用いられており、特に内視鏡で用いられる PTFE チューブは過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法で滅菌される医用器材を想定した試験片として適切であると考えた。

5mm 長に切断した外径 3mm、内径 1mm の PTFE チューブ片を高圧蒸気滅菌したものを、細胞が包埋されたコラーゲングル内に埋め込んだ場合、図 6 に示した通り、HeLa 細胞、SIRC 細胞、

Caco-2 細胞のいずれの細胞種においても PTFE チューブ片とゲルが接触している部分でホルマザン色素による発色が見られたことから、PTFE チューブ片が接触していたゲル内でも細胞は生存していたことが示された。よって、高温・高圧で滅菌した PTFE チューブ片そのものは HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞の各細胞に対してゲル内での細胞生存率を低下させるような作用は持たなかったと考える。

PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬後、風乾せずにコラーゲンゲル内に埋め込んで 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後に MTT を取り込ませることで生存した細胞を検出すると、図 7 に示した通り、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞のいずれの細胞においても、埋め込まれた PTFE チューブ片の接触している部分およびその周辺の部分ではホルマザン色素による発色が見られなかった。3%過酸化水素水に浸漬したあと風乾しなかった PTFE チューブ片が細胞が包埋されたゲルに接触すると、PTFE チューブ片が接触した部分とその周辺のゲル内に存在した細胞は生存していなかったことが示された。3%過酸化水素水に 10 分間浸漬することで、PTFE チューブ片の表面に過酸化水素が付着し、その後風乾しなかったため表面に付着した過酸化水素は分解・除去されずに残留してしまったものと考え。表面に過酸化水素が残留している状態の PTFE チューブ片を細胞が包埋されたゲル内に埋め込むと、PTFE チューブ片と接触したゲル内の細胞に対して死滅させてしまったと考える。

さらに Caco-2 細胞では、図 7e および図 7f に示した通り、3%過酸化水素水に浸漬後風乾しなかった PTFE チューブ片がゲルに接触している部分において気泡が生じていた。この気泡は細胞をコラーゲンゲルに包埋し 5%CO₂・37℃で 48 時間安定化させている間は存在せず、3%過酸化水素水に浸漬後風乾しなかった PTFE チューブ片を埋め込んでから 24 時間培養している間に生じたものである。Caco-2 細胞はカタラーゼ活性が存在することから^{30,31,32}、PTFE チューブ片の表面に付着していた過酸化水素がゲル内に移行し、ゲル内に包埋されていた Caco-2 細胞が細胞質内に持っているカタラーゼによって分解され、発生した酸素がゲル内に気泡となったものであると考える。

PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬したのち、30 分間風乾してゲル内に埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養して生細胞を検出すると、図 8 に示した通り HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞のいずれも PTFE チューブ片がゲルと接触している部分でホルマザン色素の発色が見られ、3%過酸化水素水に浸漬後 30 分間風乾した PTFE チューブ片が接触していたゲル内には細胞が生存していたことが示された。このことから、クリーンベンチ内でフィルターを通した空気を当てて 30 分間風乾すると、PTFE チューブの表面に付着していたと考えられる過酸化水素が分解・消失し、そのため、風乾した PTFE チューブを細胞が包埋されたゲル内に埋め込むと、PTFE チューブとゲル内の細胞が接触していた部分でも細胞は死滅せずに生存していたものと考え。

これらの、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞の各細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に過酸化水素で処理を施した PTFE チューブ片を埋め込んで得られた結果から、過酸化水素で滅菌した物品を細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に埋め込むことで、滅菌した物品が複雑な形状であっても、物品の形状に合わせてゲル内に包埋された細胞に接触させることができるので、滅菌した物品の表面に付着した過酸化水素が細胞に及ぼす作用を検討・評価できると考える。

過酸化水素で処理を施した PTFE チューブ片をゲル内に埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後、MTT によって生存した細胞を検出して求めた細胞生存率について、図 12 に HeLa 細胞、図 13 に SIRC 細胞、図 14 に Caco-2 細胞の結果を示した。

HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞のいずれの細胞も、3%過酸化水素水に浸漬後、風乾せずにゲル内に埋め込んだ群の方が 30 分間風乾してゲル内に埋め込んだ群よりも細胞生存率が有意に低下していた。過酸化水素水に浸漬後風乾しなかった PTFE チューブ片が接触していたゲルに包埋されていた細胞が死滅し、細胞生存率が低下したのは、PTFE チューブ片表面に付着していた過酸化水素が、ゲル内に包埋されている細胞に対して死滅に至らせるような作用を及ぼしていたためと考える。

一方、3%過酸化水素水に浸漬後 30 分風乾した PTFE チューブ片を埋め込むと、いずれの細胞も細胞生存率が 100%を超えてしまっていた。これは、滅菌しただけで過酸化水素による処理を施さなかった PTFE チューブ片を埋め込んだ群よりも過酸化水素に浸漬後 30 分間風乾した群の方がゲル内に生存した細胞が多くなってしまったことを示す。SIRC 細胞においては、濃度が 10~50 μ M の過酸化水素により細胞の増殖が促進されるという報告もあり²⁷⁾、PTFE チューブ片にごく微量の過酸化水素が付着しており、ごく微量の過酸化水素がゲル内の細胞に影響して増殖をもたらした可能性は否定できない。また、直接細胞接触法では 96 穴マイクロプレートの各ウェルに細胞を播種してウェル底面にコンフルエントに増殖し単層の細胞層を形成した段階で試験物質を作用させるために、ウェル内に添加した試験物質は単層の細胞層に均一に作用すると考える。しかし、コラーゲンゲル包埋培養法では、ゲル内に分布する細胞は立体的であり、平面方向だけでなく上下方向にも増殖できると考える。よって、PTFE チューブ片を埋め込んだ後 24 時間培養することで、ゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片が接触しなかったゲル内の細胞や、細胞に曝露した過酸化水素濃度が 0.003%~3%の範囲では死滅しなかった細胞、もしくは細胞増殖が刺激されたかもしれない細胞がゲル内で増殖した結果、過酸化水素水で処理をしなかった PTFE チューブ片を細胞が包埋されたゲル内に埋め込んだ群よりも細胞生存率が上昇してしまったと推測する。

本研究で行ったコラーゲンゲル包埋培養法では、細胞が包埋されたコラーゲンゲルを通常の細胞培養で用いられる 10%FBS を含む培養液で 48 時間 5%CO₂・37℃でインキュベートしゲル内に包埋された細胞を安定化させた。3%過酸化水素水に 10 分間浸漬したために PTFE チューブ片に付着した過酸化水素が、細胞が包埋されたゲルに埋め込まれたときにゲル内に透徹している血清成分と過酸化水素が反応することを避けるために、PTFE チューブ片を埋め込む前にゲル内に透徹している 10%FBS を含む培養液を、血清を含まない培養液に置換して行った。

図 9 に、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞において過酸化水素で処理をしなかった滅菌された PTFE チューブ片を埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養したのち生細胞を検出した結果を示す。いずれの細胞も、PTFE チューブ片がゲルに接触している部分でも均一にホルマザン色素の発色が見られ、ゲル内に包埋された細胞が埋め込まれた PTFE チューブ片に接触して FBS を含まない培地で培養しても細胞は生存していたことが示された。図 6 に示した 10%FBS を含む培地で行った結果と同様、PTFE チューブ片の接触によりゲル内の細胞生存率が

低下するような影響は見られなかった。

滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し、風乾せずにゲルに埋め込み FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養すると、図 13 に示した通り、SIRC 細胞と Caco-2 細胞では PTFE チューブ片がゲルに接触する部分でホルマザン色素による発色が薄くなっており、ゲル内の細胞は一部が死滅し生存した細胞は減少していたことがわかった。SIRC 細胞では、図 7c および図 7d に示した PTFE チューブ片を埋め込んで 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した結果と図 10c および図 10d に示した FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養した結果を比べると、いずれも 3%過酸化水素水に浸漬して風乾しなかった PTFE チューブ片がゲルと接触する部分ではホルマザン色素による発色がほとんど見られず、生存していた細胞はほとんど見られなかった。Caco-2 細胞では、図 10e および図 10f に示したとおり、3%過酸化水素水に浸漬後風乾しなかった PTFE チューブ片と Caco-2 細胞が包埋されたコラーゲンゲルが接触していた部分ではゲル内のホルマザン色素による発色は薄くなっており、生存した細胞は減少していたと考えられるが、図 7e および図 7f に示した風乾しない PTFE チューブ片をゲル内に埋め込んだ後に 10%FBS を含む DMEM 培地で培養した結果よりも、図 10e および図 10f に示されたむっ形成培地で 24 時間培養した方がゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の周辺におけるホルマザン色素による発色が強いことから、Caco-2 細胞では、過酸化水素浸漬後風乾しなかった PTFE チューブ片をゲル内に埋め込んだ場合、血清を含む培地よりも血清を含まない培地の方がゲル内で生存していた細胞は多かったと考えられる。

HeLa 細胞では、図 10a および図 b に示されたように、3%過酸化水素水に浸漬後風乾しない PTFE チューブ片をゲル内に埋め込み、FBS を含まない培地で 24 時間培養するとチューブ片の周囲にもホルマザンによる発色が見られ、ゲル内の細胞は生存していたことを示す。また、図 7a および図 7b に示した風乾しない PTFE チューブ片を HeLa 細胞が包埋されたゲル内に埋め込み 10%FBS を含む培地で 24 時間培養した時よりも、図 10a および図 10b に示した風乾しない PTFE チューブ片を HeLa 細胞が包埋されたゲル内に埋め込み、無血清の培養液で 24 時間培養した方が埋め込まれた PTFE チューブ片周囲のゲル内の細胞の生存が少なかったことがわかった。これらの結果から、PTFE チューブ片に付着していた過酸化水素によって、血清を含む培養液にある成分が酸化などの反応を受けてゲル内に包埋された細胞に死滅が増加するような影響を与えているものと考えられる。

コラーゲンゲル包埋培養法において、過酸化水素で処理をした PTFE チューブ片を細胞が包埋されたゲル内に埋め込んだのち、10%FBS を含む培養液で 24 時間培養したときのゲル内の細胞生存率と、血清を含まない培養液で 24 時間培養したときのゲル内の細胞生存率を比較した。各細胞の細胞生存率を HeLa 細胞は図 12・SIRC 細胞は図 13・Caco-2 細胞は図 14 に示したが、いずれの細胞においても、3%過酸化水素水に PTFE チューブ片を浸漬後、風乾せずにゲル内に埋め込んだ群の方が 30 分間風乾してからゲル内に埋め込んだ群よりも細胞生存率が低下する傾向があり、30 分間風乾した PTFE チューブ片を埋め込むとそのゲルにおける細胞生存率は 100%前後となり細胞生存率は低下しない傾向が示された。

過酸化水素水に浸漬後風乾せずにゲル内に埋め込んだ群で、10%FBS を含む培地で行った群と FBS を含まない培地で行った群を比較すると、FBS を含まない培地で行った群のほうが細胞生存

率は高くなる傾向が示された。3%過酸化水素水に浸漬した後風乾しなかった PTFE チューブ片をゲル内に埋め込み、10%FBS を含む培地で 24 時間培養してゲル内の生存細胞を検出した図 7 と無血清培地で 24 時間培養してゲル内の生存細胞を検出した図 10 を比較すると、無血清培地で 24 時間培養した方が PTFE チューブ片の周囲において生存した細胞が多かったという結果と一致した。

過酸化水素で処理をした PTFE チューブ片を細胞が包埋されたゲル内に埋め込み、血清を含む培養液で培養すると、血清を含まない培養液で培養したときよりもゲル内の細胞生存率が低下する傾向が見られたことから、3%過酸化水素水に浸漬した PTFE チューブ片に付着していた過酸化水素が、ゲル内に浸透していた血清や培養液の成分と接触して反応して生成した物質が、ゲル内に包埋された細胞の生存率を低下させていたことが考えられる。

過酸化水素はヒドロキシルラジカルを生成し、ヒドロキシルラジカルが生体分子を構成する有機物を酸化する。過酸化水素からヒドロキシルラジカルを生成する反応は、 Fe^{2+} や Cu^{2+} が触媒する。今回の研究で行った細胞培養で用いられた DMEM 培地や FBS には、微量ながらも Fe^{2+} が含まれており、この微量の Fe^{2+} が過酸化水素からヒドロキシルラジカルを生成を促進することで、培養液中に含まれている有機物または細胞を構成する生体分子の酸化により細胞の死滅が引き起こされ、細胞生存率が低下したと考える。直接細胞接触法では、曝露する過酸化水素は滅菌した蒸留水で希釈して調製したので、培養液や血清に含まれている有機物や PBS に含まれている電解質と過酸化水素が反応を起こさない条件下で細胞に直接過酸化水素を作用させることができた。コラーゲンゲル包埋培養法では、ゲル内に浸透していた培養液は血清を含むものでも実験を行い、無血清の培地で行った条件でも DMEM 培地の成分は含まれており、過酸化水素と有機物が接触して反応できる環境であった。コラーゲンゲル包埋培養法でも、曝露する過酸化水素から生成したヒドロキシルラジカルが培養液中の有機物を酸化しない条件下で過酸化水素をゲル内に包埋された細胞に作用させる必要がある。そのためにも、ゲルを培養する際は血清を含まない培地を用いたほうがより正確な検討ができると考える。さらには、培地のように多くのアミノ酸など有機物を含むものではなく、グルコースなど必要最低限の物質のみを含み、浸透圧や栄養不足による細胞の死滅をできるだけ少なくした系で細胞が包埋されたゲルを安定化させて過酸化水素を曝露することで、さらに正確な過酸化水素の影響を検討、評価できると考える。

直接細胞接触法で、図 2 に示した HeLa 細胞と図 4 に示した HDFa 細胞では、細胞に曝露した過酸化水素濃度が上昇するのに従って細胞生存率が減少し、曝露した過酸化水素濃度に依存して細胞生存率が減少する傾向が見られた。さらに、過酸化水素に曝露した後 24 時間 10%FBS を含む培地で培養しても、細胞生存率は曝露した過酸化水素の濃度に依存して減少していた。

図 3 に示した SIRC 細胞における直接細胞接触法では、過酸化水素を曝露した直後での細胞生存率は過酸化水素濃度が 0.003%から 0.06%までは 80%前後であり、過酸化水素濃度が 0.3%になると 40%前後まで大きく減少していた。過酸化水素を曝露したのち 24 時間 10%FBS を含む DMEM 培地で培養した後の細胞生存率は、過酸化水素濃度が 0.3%以上になると 10%以下に低下しており、曝露した過酸化水素の濃度が上昇すると死滅に至る細胞が多くなることがわかった。図 7 および図 10 に示した SIRC 細胞におけるコラーゲンゲル包埋培養法でも、3%過酸化水素水

に浸漬して風乾しなかった PTFE チューブ周辺のゲル内では SIRC 細胞は生存していなかったことが示されたことから、過酸化水素が付着していた PTFE チューブ片によって SIRC 細胞が死滅したことがわかった。SIRC 細胞では、過酸化水素を水と酸素に分解する酵素であるカタラーゼよりも、スーパーオキシドアニオンから過酸化水素を生成する反応を触媒する酵素であるスーパーオキシドジムスターゼのほうが活性が高いという報告があり³³⁾、SIRC 細胞では過酸化水素による作用を受けやすいことが考えられ、SIRC 細胞に過酸化水素が作用して細胞に対して死滅させたと考える。

図 5 に示した Caco-2 細胞における直接細胞接触法では、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% までは細胞生存率は 80% から 65% までの低下であったが、曝露した過酸化水素濃度が 0.3% になると細胞生存率は 15% に減少し、曝露した過酸化水素濃度が 0.6% になると細胞生存率は 3% 以下にまで低下した。Caco-2 細胞も SIRC 細胞と同様に、曝露する過酸化水素濃度が 0.3% になると細胞生存率が大きく低下する傾向が見られた。

ヒト結腸粘膜の生検試料を用いた実験で、結腸粘膜組織と肝細胞でスーパーオキシドジムスターゼやカタラーゼ活性を比較すると、結腸粘膜組織の方が肝細胞よりも低いことが報告されており³²⁾、Caco-2 細胞のようなヒト結腸粘膜由来の細胞は過酸化水素による作用を受けやすいことが考えられる。また、ヒト結腸粘膜組織及び Caco-2 細胞のスーパーオキシドジムスターゼおよびカタラーゼ活性を解析すると、粘膜層よりも粘膜上皮細胞内の活性の方が高いことが報告されており³²⁾、図 7e および図 7f に示した、Caco-2 細胞におけるコラーゲンゲル包埋培養法で 3% 過酸化水素水に浸漬した後風乾しなかった PTFE チューブ片をゲル内に埋め込んだ際、PTFE チューブ片とゲルが接触した部分で発生した気泡は、過酸化水素が Caco-2 細胞内に存在するカタラーゼにより分解されて酸素を生じた際の気泡であると考えられる。

Wijeratne らは、Caco-2 細胞に対して 0~250 μ M の範囲で過酸化水素を無血清培地に添加して 30 分間作用させると、カタラーゼ活性は変化しないが、スーパーオキシドジムスターゼ活性は低下しグルタチオンペルオキシターゼ活性が上昇することを報告している³⁰⁾。グルタチオンペルオキシターゼは、細胞質内で過酸化水素から水と酸素への代謝を行っており、本研究で曝露した過酸化水素の濃度が 0.003% から 0.06% までの間は細胞内に備わっているカタラーゼとグルタチオンペルオキシターゼにより過酸化水素が代謝されるために細胞生存率の低下は小さかったが、曝露した過酸化水素濃度が 0.03% よりも高くなると、曝露された過酸化水素が細胞内に備わっている酵素では細胞の生存に影響がないレベルまで代謝されず、その結果死滅してしまった細胞が大きく増加したと考える。

図 5 に示した Caco-2 細胞における直接細胞接触法で、過酸化水素を曝露した後 24 時間 10% FBS を含む DMEM 培地で培養した後の細胞生存率は、曝露した過酸化水素の濃度が 0.03% よりも高くなると 30% 以下に低下していた。0.03% の過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率は 70% であり、過酸化水素を曝露した後、通常の血清を含む培地で培養している間に死滅した細胞が存在したことを示す。Caco-2 細胞に対し過酸化水素を 100 μ M 加えた 10% FBS を含む培養液で 24 時間作用させると細胞生存率は 20% に低下したという実験結果があり³⁴⁾、Caco-2 細胞は過酸化水素曝露の時間が長いと死滅する細胞が多くなるという特徴のある細胞であり、また、本研究の結果から過酸化水素に曝露した後に通常の培養液で 24 時間培養している間に死滅する細胞が多

くなる特徴をもつ細胞であることがわかった。

直接細胞接触法およびコラーゲンゲル包埋培養法で 4 種の細胞の過酸化水素に対する細胞生存率をみると、細胞種によって過酸化水素に対する反応性は異なることがわかった。よって、培養細胞を用いて過酸化水素の影響を評価するためには、過酸化水素が暴露される可能性がある臓器や組織由来の細胞を選び、複数の細胞種において影響を検討し評価する必要があると考える。

過酸化水素は液体の状態である液相のみではなく、気体の状態である気相でもアミノ酸などの有機物を酸化する能力を有しており³⁵⁾、その性質を用いて、内視鏡のように形状が複雑で高温・高圧に耐えられない医用機材の滅菌^{8,36)}や、病室や処置室など医療環境表面の殺菌を行うことに応用され^{8,10)}、ウイルスに対する効果も検討されている³⁷⁾。また、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法や過酸化水素ガス低温滅菌法では、滅菌効果を示す過酸化水素は気相の状態であることから、気相における過酸化水素の生体に対する影響を検討、評価する必要があると考える。

本研究で用いた細胞直接接触法は、培養液に含まれる有機物と過酸化水素の反応を除いて細胞に対する作用を評価するために有効な方法であるが、作用させる過酸化水素は液相であり、また、作用させる細胞も液体の中に存在しないと浸透圧や乾燥によって傷害が大きくなってしまふことが考えられる。

コラーゲンゲル包埋培養法では、細胞が包埋された固形のコラーゲンゲルを用いるので、細胞を浸透圧の変化や乾燥する環境下に晒すことなくコラーゲンゲル内に包埋された細胞に気相の過酸化水素に曝露することが可能であると考ええる。曝露後のゲル内の細胞生存率やゲル内で生存した細胞もしくは死滅した細胞の分布を評価することで、気相の過酸化水素が直接細胞に与える影響を評価する方法になると考える。

近年では、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法や過酸化水素ガス低温滅菌法が、低温で滅菌するため様々な医用器材に用いることができ、滅菌後にエアレーションの必要がなく滅菌工程が短時間で済む¹⁾という利便性や、機器設置の際に特殊な配管などが不要で機器を設置しやすいという点で多くの医療機関で普及している⁹⁾。この滅菌法では、滅菌チャンバー内を減圧し、気化した過酸化水素を注入して拡散させる過程で行われるが、この過程で排出される排気中に 200ppm 近い濃度の過酸化水素ガスが放出されることが報告されている⁸⁾。

気相の過酸化水素濃度と、液体に含まれる液相の過酸化水素濃度を単純比較することはできないが、200ppm はパーセント濃度では 0.02% となり、本研究で行った直接細胞接触法の結果と比較すると、SIRC 細胞は図 3 で示した結果より 80% 前後、HeLa 細胞は図 2、Caco-2 細胞は図 5 で示した結果より 70% 前後、HDFa 細胞は図 4 で示した結果より 65% 前後の細胞生存率であることが予想される。細胞生存率が 50% 以下になるような顕著な影響を与える濃度ではないが、それでも 20~30% 前後の細胞が死滅することを示す濃度であり、細胞が死滅しない正常な条件と比較すると十分に細胞に影響を及ぼしている濃度であると考ええる。気相の過酸化水素が生体にどのように影響するのかを検討するために、培養細胞に対して気相の過酸化水素を曝露して影響を評価することが必要であると考ええる。

過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌器による滅菌運転中、もしくは滅菌終了後に滅菌チャンバーから滅菌物を取り出す際に、滅菌業務従事者に対する有害事象として、アメリカ合衆国において

2008 年 3 月 4 日から 2012 年 1 月 26 日の間に、手指皮膚・眼・咽頭・気道の傷害と異臭が報告されている¹⁶⁾。日本でも、過酸化水素ガス滅菌を行っている 774 施設のうち、28.8%に当たる 136 施設より滅菌業務従事者への有害事象が発生していたという報告があり、日本における有害事象も、眼の充血や手指・腕の皮膚障害、咽頭や気道への刺激、悪臭が挙げられている¹⁷⁾。

本研究では *in vitro* 系で過酸化水素の作用を検討するために、広く毒性試験に用いられている HeLa 細胞、消化管粘膜組織を構成する上皮細胞由来の Caco-2 細胞、ヒト皮膚由来の HDFa 細胞、角膜由来の SIRC 細胞に過酸化水素を曝露した。HeLa 細胞では、図 2 に示した通り、曝露した過酸化水素の濃度に依存して細胞生存率が減少する傾向があり、SIRC 細胞では図 3 に示した通り 0.06% よりも高い過酸化水素濃度で大きく細胞生存率が低下する傾向が見られ、報告された眼や手指の皮膚に対する有害事象と矛盾しない結果となった。滅菌業務に際しては、過酸化水素ガスが漏れていたたり、滅菌物の表面に過酸化水素が付着していた場合を想定して、滅菌業務従事者の皮膚や眼への曝露に留意するべきであると考ええる。

また、プラスチック製品に過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌を施すと、滅菌終了直後、プラスチックの材質によっては 300ppm 以上の過酸化水素がプラスチック表面から検出されたことが報告されている^{13,14)}。本研究で行った直接細胞接触法で 0.03% の過酸化水素を細胞に曝露したときの細胞生存率は、図 2 より HeLa 細胞では 72%、図 3 より SIRC 細胞では 80%、図 4 では HDFa 細胞では 65%、図 5 より Caco-2 細胞では 70% であった。曝露した過酸化水素の濃度が 0.03% のとき細胞によって影響に違いがあることや、プラスチック表面に付着していた過酸化水素濃度と培養細胞に曝露した液相の過酸化水素濃度とを直接比較することは難しい点はあるが、本研究で用いた 4 種の細胞に対して曝露した過酸化水素濃度が 0.03% (300ppm) でも細胞生存率は 20~30% に低下したことから、死滅した細胞が存在したことが考えられる。また、本研究で行った直接細胞接触法で作用させた過酸化水素水の濃度で最も低い 0.003% でも、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞では細胞生存率が 80% 程度であった。特に Caco-2 細胞では、0.003% の過酸化水素を曝露したのちに 24 時間通常の培養液で培養すると、表 4 に示した吸光度の結果から、滅菌水のみを曝露した control の吸光度に比べて 0.003% の過酸化水素を曝露したときの吸光度が有意に低下しており、曝露した過酸化水素濃度が 0.003% における細胞生存率は 60% に低下していたことから、Caco-2 細胞は過酸化水素が 0.003% であっても死滅する影響が強く表れることが考えられる。

消化管の粘膜組織に関連して、歯科領域において、歯の漂白（ホワイトニング）のために 35% 濃度の過酸化水素を含むゲル状の漂白剤を用いる。ウシの歯から採取したエナメル質と、象牙芽細胞様細胞の MDPC-2 細胞に対して、ホワイトニングに用いる 35% 過酸化水素を含む漂白剤を 15 分間作用させると、細胞の代謝活性が 61~62% ほどに低下し、細胞を走査型電子顕微鏡で観察すると、培養器の表面からはがれ、対照群と比較すると縮小してしまった細胞が多く加算つされている³⁸⁾。また、口腔内のケアのために 3% 濃度の過酸化水素水であるオキシドールが用いられている³⁹⁾。口腔内の粘膜は重層扁平上皮で構成され、単層円柱上皮で構成される結腸の粘膜と比較すると物理的にも化学的にも耐性が高い粘膜組織であるが、過酸化水素が直接粘膜組織や、粘膜を構成する細胞に接触すると、接触した過酸化水素の濃度が高いほど粘膜上皮細胞の傷害は大きくなることが考えられ、それは、粘膜組織内で組織レベルの傷害を引き起こす原因となるこ

とも考えられる。過酸化水素が粘膜組織に直接接触することに留意する必要があると考える。

滅菌された器材の表面に残留した滅菌剤による毒性について、竜らはコラーゲンゲル包埋培養法でフタラル・グルタラル・過酢酸に浸漬したポリウレタン・シリコン・PTFE の各試験片で細胞毒性について試験した結果、PTFE はフタラル・グルタラル・過酢酸のいずれの滅菌剤に対しても残留毒性は示さなかったが、ポリウレタンとシリコンではフタラルとグルタラルに過酸化水素が残留し、培養細胞を用いて細胞毒性が見られたことを報告している²³⁾。また、様々なプラスチック素材に過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法を行うと、ポリスチレンやポリメチルテレフタレートなど一部のプラスチック素材において残留毒性が見られたことも報告されている⁴⁰⁾。本研究では、コラーゲンゲル包埋培養法で用いた試験片は 30%過酸化水素水に PTFE チューブ片を浸漬したのみであり、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法で行われるように高濃度の過酸化水素ガスに晒されたり急激な気圧の変化を起こさない環境下で、使用した試験片も実際の医用器材に用いられるような複雑な形状のものではないので条件がかなり異なる。実際に行われる滅菌法では、滅菌される医用器材は高濃度の過酸化水素ガスや気圧の急激な変化を伴うことを考慮し、過酸化水素ガス滅菌後、滅菌された医用器材の表面に付着し、分解されずに残留してしまう過酸化水素について留意しなければならないと考える。そして、気相の過酸化水素は、水分に溶解し数十%もの高濃度に濃縮されることも指摘されている⁴¹⁾。過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法のように気相の過酸化水素を利用する際は、滅菌する機材の材質だけでなく、器材表面に水分が付着して異なることを確認し、滅菌後に器材表面に過酸化水素が残留しないように留意することが大切であると考えられる。

内視鏡ファイバースコープに過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌を施すと、滅菌終了直後ではファイバースコープ表面より 75ppm の過酸化水素が検出されたことが報告されている¹⁵⁾。内視鏡が患者に用いられる際、最も接触する可能性が高い組織は粘膜組織であると考えられる。本研究で用いた培養細胞のうち、粘膜組織由来の細胞は結腸粘膜由来の Caco-2 細胞であり、下部消化管に用いられる内視鏡が直接接触する可能性が高い組織を構成する細胞である。本研究で行った Caco-2 細胞において、直接細胞接触法で曝露した過酸化水素濃度が 0.006%のときの細胞生存率が滅菌終了後にファイバースコープ表面より検出された過酸化水素の濃度である 0.0075%のときの細胞生存率と最も近い値と考えると、Caco-2 細胞は 77%であった。そして、0.006%の過酸化水素を 10 分間曝露して 10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養したときの細胞生存率は 62%となり、過酸化水素曝露直後の細胞生存率よりも低下していた。過酸化水素が付着した内視鏡を消化管粘膜に使用した場合を想定すると、内視鏡の表面に付着していた過酸化水素が消化管粘膜の上皮細胞に触れた直後に粘膜上皮細胞に対して死滅に至る作用を及ぼす場合と、過酸化水素が粘膜表皮細胞に接触して 24 時間の間に死滅に至るような作用があることが考えられる。

Caco-2 細胞におけるコラーゲンゲル包埋培養法で、内視鏡ファイバースコープの内筒に用いられている素材である PTFE 製のチューブを 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬し、風乾せずに Caco-2 細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に埋め込むと、図 7e・図 7f および図 10e・図 10f に示した通り、PTFE チューブ片が接触していた部分のゲル内の細胞が生存していなかった。PTFE チューブ片を 10 分間 3%過酸化水素水に浸漬した後に表面に付着していた過酸化水素の濃度は測定していないが、PTFE チューブ片の表面に過酸化水素が付着していたために、PTFE チューブ片が接

触していたゲル内の細胞が死滅し細胞生存率が低下したと考える。

消化管などの粘膜上皮組織は、平滑筋層の上に粘膜下組織があり、その上の粘膜固有層を足場として粘膜上皮細胞が配置されている。管腔側の最上層には粘液を分泌する粘膜上皮細胞から分泌された粘液がある。本研究で行った直接細胞接触法やコラーゲンゲル包埋培養法は Caco-2 細胞という粘膜上皮細胞のみの実験系であり、実際に内視鏡などの医用器材が接触する粘膜組織は粘液層を含む組織であるため実際の生体の環境とは異なっている。コラーゲンゲル包埋培養法で、Caco-2 細胞が包埋されたゲル層の上に粘液中の成分を添加したゲルを重層するなどの改良を行って生体組織に近い条件で培養細胞を用いて、滅菌物に付着した過酸化水素の作用を検討できる可能性がある。

本研究で行った直接細胞接触法により、過酸化水素は HeLa 細胞、SIRC 細胞、HDFa 細胞、Caco-2 細胞に対して、曝露した過酸化水素濃度が 0.3%以上で細胞生存率が 50%以下となり細胞に対して死滅させる顕著な作用があったことと、曝露した過酸化水素濃度が 0.003%から 0.06%の間でも細胞生存率が低下していたことから、過酸化水素を直接培養細胞に曝露すると細胞が死滅するような作用を及ぼしていたことがわかった。

また、コラーゲンゲル包埋培養法により、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞では、過酸化水素が付着している PTFE チューブ片がゲル内に包埋された培養細胞に接触することでゲル内に包埋された培養細胞のうちゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲の細胞が死滅していたことがわかり、過酸化水素が付着した物体が細胞に接触することで細胞が死滅するという影響を及ぼしていることが考えられた。

これら直接細胞接触法やコラーゲンゲル包埋培養法の結果より、内視鏡のような生体組織に直接接触させて使用する医用器材の表面に過酸化水素が付着していた場合、生体組織を構成する細胞に対して付着していた過酸化水素が傷害をもたらし、それが組織の炎症などの症状を引き起こす原因となることが示唆された。そして、過酸化水素ガス滅菌を施した医用器材が患者に影響を及ぼさず安全に用いられるように、過酸化水素低温ガスプラズマ滅菌法や過酸化水素ガス低温滅菌法によって医用器材を滅菌する際は、器材表面の過酸化水素の残留に注意しなければならないと考える。

結論

直接細胞接触法を用いて、HeLa 細胞、SIRC 細胞、HDFa 細胞、Caco-2 細胞に対して過酸化水素濃度を 0.003%から 3%の範囲で曝露すると、すべての細胞種において 0.06%から 3%の間で細胞生存率が 50%よりも低くなった。直接細胞接触法は細胞の培養液に含まれている有機物と過酸化水素が反応せずに細胞に過酸化水素を反応させることができるので、0.06%から 3%の間で過酸化水素は細胞に対して細胞生存率を低下させるような影響を及ぼしていたと考える。

また、コラーゲンゲル包埋培養法を用いて、3%過酸化水素水に 10 分間浸漬したあと風乾しなかった PTFE チューブ片を細胞が包埋されたゲル内に埋め込むとゲル内の細胞の生存率が低下したことから、過酸化水素が付着している物質が細胞に接触すると、細胞が死滅して細胞生存率が減少するような影響を及ぼすと考える。

これらの結果から、直接細胞接触法によって、HeLa 細胞、ヒト皮膚由来の HDFa 細胞、角膜由来の SIRC 細胞、ヒト結腸粘膜由来の Caco-2 細胞のいずれの細胞に対しても過酸化水素を細胞に直接曝露すると細胞の生存を低下させるような作用があったことが明らかになった。また、コラーゲンゲル包埋培養法で、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞に対して過酸化水素が付着している可能性がある PTFE チューブ片がゲル内の細胞に作用して細胞の生存を低下させるような作用があったことが明らかになった。

謝辞

本研究を遂行するに当たり、博士課程入学から今日まで多大な御指導と御鞭撻を賜り、そして本論文を作成するに際して厳しくかつ親身な御助言をたくさん賜りました、東京医療保健大学大学院医療保健学研究科長 小林 寛伊 教授に深く感謝を申し上げます。

小林教授には、博士課程入学に際して、感染制御学という初めて踏み入れる学問分野において、私が専攻した生物学や解剖学の知識と経験を十分に生かすことができるよう、研究テーマを決定するために貴重なアドバイスやアイディアをたくさん賜りました。本論文としてまとめたこの研究も、そのような小林教授の貴重なアドバイスにより成し得ることができました。そして何よりも、博士課程に入学して学ばせて頂いた経験により、本学で一教員としてただ解剖生理学を学部学生に講義するだけでなく、広い視野を持って研究や世の中の医療や科学技術の進歩に常に目を向けていなければならないことを教わりました。今後も大学教員・研究者として身を立ててゆかんとする私にとって、その教えはかけがえのないものです。改めて、東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科への入学を認めてくださったことにも感謝申し上げます。

このような中途半端な私を、温かく、時には厳しくご指導賜り見守って下さいました東京医療保健大学大学院 医療保健学研究科 大久保 憲 教授、梶浦 工 教授、遠藤 博久 准教授、菅原 えりさ 准教授、そして加えて、実験施設使用の道をも切り開いてくださった吉田 理香 准教授に厚く感謝申し上げます。先生方の知識と経験をご教授頂き、自分の視野や知見を広げることができました。先生方の感染制御学の研究に対する熱い情熱にも強く突き動かされました。

また、本論文を作成するにあたって、東京工業大学 大学院生命理工学研究科 生物プロセス専攻 岩澤 篤郎 特任准教授には、実験データの解釈や考察について非常に貴重な助言をたくさん賜り、本研究の意義を改めて強く認識させて頂きました。厚く御礼申し上げます。

共に感染制御学の研究に勤しんで参りました大学院博士課程の学友の皆様にも厚く御礼申し上げます。学友の皆様の、忙しい勤務の中であってもひたむきに研究されている姿を垣間見て、「自分は甘い、もっと励まなければ」と自分を戒めることができました。このような、本学大学院博士課程で出会えることができた先生方や学友の皆様の存在があり、私は本論文をまとめるに至ることができました。本当に、感謝の言葉では表現できないほどの感謝でいっぱいです。

本研究を実際に遂行するために、細胞培養やその他さまざまな実験の技術や機会を提供して下さいました、サラヤ株式会社バイオケミカル研究所の皆様にも、感謝してもしきれない気持ちでいっぱいです。細胞培養にはクリーンベンチやインキュベーターなど特殊な実験機器を使わなければならない、多忙な業務の中そのような特殊な実験機器を使わせて頂きました。大変有難く思うのと同時に、業務に支障を来してしまったのではないかと大変申し訳なく思っております。

まず、古田 太郎 技術顧問（前研究所長）より実験の概略を紹介していただきました。このような中途半端な私でも非常に興味・関心が高まる実験系で、「この研究・実験はできる、やりたい」と確信いたしました。本研究はそれからの3年間の成果をまとめたものであり、また、これまでの3年間の積み重ねからさらに今後も発展させて追求できるテーマであると考えております。このような貴重なテーマについて追及する機会を与えてくださった古田博士に深く感謝申し上げます。

さらに、平田 善彦 研究所長に、本研究の意義を理解していただき研究所で実験を行うことについて御理解と御協力を頂きました。大学の講義がない夏期および春期の授業休業期間に集中的に研究所に赴かせていただきましたが、そのような不規則で身勝手な実験計画にもかかわらず、研究所における実験を御承諾して頂けたこと、大変感謝しております。また、平田所長とのディスカッションの中で、消毒剤に関する基礎研究を発展させることの重要性を認識できました。

培養細胞を用いた、様々な工夫を凝らした実際の実験方法を指南していただき、研究所における実験を円滑にできるよう様々なご配慮を賜りました 竜 瑞之 次長なしには、本研究の遂行は絶対にあり得ませんでした。竜次長には、豊富な製品開発や研究の経験と知識から本研究の実験で得られたデータの解釈や今後の実験の方針など適切かつ貴重なアドバイスを頂きました。実験に関するディスカッションの中で、企業研究所という大学研究室とは違った環境で研究に励まれていらっしゃる企業人の、製品開発や研究に対する厳しいまなざしを直に知ることができました。大学しか知らない世間知らずな生ぬるい私に対して強いインプレッションを与えてくださいました。また、細胞培養など基礎的な実験から暫く離れておりました私にとって、実験に関する技術論的なアドバイスだけでなく、実験結果の解釈に関するディスカッションを深める中で、実験を進める為に必要な勘のようなものを思い出させて頂きました。本当に、ご多忙の中ありがとうございました。

そのような製品開発の厳しさの中で、石井 七瀬 主任には、大変なご多忙の中、具体的な実験のための試薬の調製や具体的な細胞培養法についてご指南いただきました。実際の実験手技に関するアドバイスの中で、企業人として製品開発や研究に従事されている石井主任と、研究のみの目的で実験している自分では、やはり何かが違う、研究に対する厳しさが違うと思わざるを得ませんでした。細胞をコンタミネーションさせたり、血清や試薬を使い切ってしまったたり、本当に、ご迷惑をおかけしました。

私は、一度は大学院に在籍したものの、学位取得にならず道半ばで挫折しました。そして、解剖を教えることを看護教育の場で行いたいという希望から、看護を学ぶべく看護短期大学に入学しました。このような中途半端な人生を歩んできた私を、看護学生として座学や実習にもがき苦しんでいた時から、短期間の病院看護師、4年間の看護専門学校での教員を経て本学の教員になるまでの過程を共にし、支えて頂き、そして年齢 40 歳近くになって再び学位取得を志し大学院に入学するという大変な我儘を許して下さった妻 智恵 に深く感謝いたします。

引用文献

- 1) Rutala WA, Weber DJ. The Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC): Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008: 63-64.
- 2) European Union Risk Assessment Report: hydrogen peroxide, CAS No: 7722-84-1 EINECS No: 231-765-0. Series: 2nd Priority List, Volume 38. Luxembourg: Official Publications of the European Communities 2003: 55-133
- 3) Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012; 142: w13659.
- 4) Fujita T. Formation and removal of reactive oxygen species, lipid peroxides and free radicals, and their biological effect. *YAKUGAKU ZASSHI*. 2002; 122(3): 203-218.
- 5) Tripathi BJ, Tripathi RC. Hydrogen peroxide damage to human corneal epithelial cells in vitro. Implications for contact lens disinfection systems. *Arch Ophthalmol*. 1989 Oct; 107 (10): 1516-1519.
- 6) Konynenbelt 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 :286-297.
- 7) Gül den M, Jess A, Kammann J, Maser E, Seibert H. Cytotoxic potency of H₂O₂ in cell cultures: impact of cell concentration and exposure time. *Free Radic Biol Med*. 2010 Nov 1;49(8):1298-305.
- 8) Shintani H. Application of vapor phase hydrogen peroxide sterilization to endoscope. *Biocontrol Sci*. 2009; 14: 39-45.
- 9) Yoshida R, Kobayashi H. New Findings on Hydrogen Peroxide Gas Sterilisation. *Journal of Japanese Association for Operating Room Technology*. 2012; 33 (3): 273-284.
- 10) Kobayashi K, Yoshida R, Kajiura T, Sogawa Y. Decontamination of environmental surfaces of patient room by hydrogen peroxide vapourised. *Journal of Healthcare-associated Infection*. 2010; 3 (2) : 15-18
- 11) 吉田理香, 小林 寛伊. 医療環境表面の殺菌方法 蒸気化過酸化水素 Hydrogen peroxide vapourised について. *感染制御JICP*. 2011; 7 (6) :521-525.
- 12) Yoshida R, Kobayashi H, Tanaka K, Urai M. False Reaction of Chemical Indicator for Hydrogen Peroxide Vapour Sterilisation. *Jpn J Med Instrument* . 2011; 81 (5) : 414-420.
- 13) Yoshida R. Residual Hydrogen Peroxide On Plastic Materials After Low-Temperature Hydrogen Peroxide Gas Plasma Sterilisation. *Journal of Japanese Association for Operating Room Technology*. 2013 ;34 (2) :145-153.
- 14) Yoshida R, Kobayashi H. Influence of Hydrogen Peroxide Sterilisation on Plastic Surface. *Journal of Healthcare-associated Infection*. 2013; 6: 19-23.

- 15) Kobayashi H, Yoshida R. Hydrogen Peroxide Vapourised from Surface of Fiberscope after Low Temperature Hydrogen Peroxide Sterilisation. *Jpn J Med Instrument* . 2012; 82 (3) : 414-420.
- 16) 吉田理香, 小林 寛伊. STERRAD®に関するアメリカ合衆国食品医薬品局医療機器有害事象報告 (MAUDE) データベースの2008年3月4日～2012年1月26日に関する内容. *医療機器学*. 2012; 82 (3) :284-288.
- 17) 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 (1) : 28-33.
- 18) B. Ekwall, V. Silano, A. Paganuzzi-Stammati, F. Zucco. Toxicity Tests with Mammalian Cell Cultures. In: P. Bourdeau, E. Somers, G. M. Richardson, J. R. Hickman. *Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects*. Chichester : Wiley 1990; 75-97.
- 19) 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: 316-322.
- 20) Iwasawa A, Nakamura Y. Cytotoxicity and effect and Influence of Povidone-iodine on Wounds in Guinea Pig. *Kansenshogaku Zasshi* . 2003; 77: 948-956.
- 21) Gebicki S, Gebicki JM. Formation of peroxides in amino acids and proteins exposed to oxygen free radicals. *Biochem J*. 1993 ; 289: 743-749.
- 22) 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: 221-225.
- 23) Ryu M, Kobayashi T, Kawamukai E. Cytotoxicity Assessment of Residual High-Level Disinfectants. *Biocontrol science* 2013; 18: 217-220.
- 24) Singh M, Sharma H, Singh N. Hydrogen peroxide induces apoptosis in HeLa cells through mitochondrial pathway. *Mitochondrion*. 2007 ; 7 (6): 367-373.
- 25) Pallepati P, Averill-Bates DA. Activation of ER stress and apoptosis by hydrogen peroxide in HeLa cells: protective role of mild heat preconditioning at 40°C. *Biochim Biophys Acta*. 2011 ; 1813 (12): 1987-1999.
- 26) Higuchi Y, Linn S. Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondria or cells. *J Biol Chem*. 1995 ; 270 (14): 7950-7956.
- 27) 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: 1723-1734.
- 28) Joyce NC, Zhu CC, Harris DL. Relationship among oxidative stress, DNA damage, and proliferative capacity in human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 ; 50 (5): 2116-2122.

- 29)González-Espinosa D, Pérez-Romano L, Guzmán-Soriano B, Arias E, Bongiovanni CM, Gutiérrez AA. Effects of pH-neutral, super-oxidised solution on human dermal fibroblasts in vitro. *Int Wound J*. 2007 ; 4(3): 241-50.
- 30)Wijeratne SS, Cuppett SL, Schlegel V. Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. *J Agric Food Chem*. 2005; 53 (22): 8768-8774.
- 31)Rao R. Oxidative stress-induced disruption of epithelial and endothelial tight junctions. *Front Biosci*. 2008 ; 13: 7210-7226.
- 32)Grisham MB, MacDermott RP, Deitch EA. Oxidant defense mechanisms in the human colon. *Inflammation*. 1990 ;14(6):669-80.
- 33)Hull DS. Oxygen free radicals and corneal endothelium. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1990;88:463-511.
- 34)Sakuma S, Abe M, Kohda T, Fujimoto Y. Hydrogen peroxide generated by xanthine/xanthine oxidase system represses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 2015; 56(1) : 15-19.
- 35)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(10):2108-15.
- 36)Klapes NA, Vesley D. Vapor-phase hydrogen peroxide as a surface decontaminant and sterilant. *Appl Environ Microbiol*. 1990 ;56(2):503-6.
- 37)Goyal SM, Chander Y, Yezli S, Otter JA. Evaluating the virucidal efficacy of hydrogen peroxide vapour. *J Hosp Infect*. 2014; 86 (4): 255-259.
- 38)神野恵治, 茂木健司, 笹岡邦典, 根岸明秀. 各種口腔ケアの効果に関する検討 : 口腔常在菌を指標として-第2報 各種含嗽剤による含嗽効果の検討. *Kitakanto med j*. 2008; 58(1): 1-7.
- 39)Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J, Costa CA. Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells. *Braz Dent J*. 2009; 20 (4): 267-274.
- 40)Ikarashi Y, Tsuchiya T, Nakamura A. Cytotoxicity of medical materials sterilized with vapour-phase hydrogen peroxide. *Biomaterials*. 1995 ;16(3):177-83.
- 41)小寺恵介、塩原卓也. 過酸化水素蒸気の濃縮を生じさせない無菌室の除染技術について. 日本PDA 学術誌 GMP とバリデーション. 2010; 12 (1): 1-7.

表 1 HeLa 細胞を用いた直接細胞接触法における吸光度

	control	0.003%	0.006%	0.03%	0.06%	0.3%	0.6%	3%
曝露直後 (n=24)	0.5717	0.4853	0.3973	0.3766	0.3463	0.1679	0.0878	0.0434
曝露後 24 時間 (n=9)	0.5470	0.5153	0.4898	0.4304	0.4480	0.1390	0.0220	0.0034

直接細胞接触法を用いて HeLa 細胞に対して過酸化水素を 0.003%～3%の範囲で 10 分間曝露し、曝露直後に MTT アッセイを行った結果得られた吸光度と、曝露後 24 時間通常の培地で培養した後に MTT アッセイを行って得られた吸光度を示す。control は過酸化水素を希釈した滅菌水のみを 10 分間曝露したものを示す。

曝露直後において、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.003%から 0.03%の吸光度では有意差はなかったが、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.06%から 3%の吸光度では有意差が見られた($p<0.05$)。

曝露後 10%FBS を含む培地で 24 時間培養してから MTT アッセイを行うと、control 群の吸光度と曝露した過酸化水素濃度が 0.003%から 0.3%の間の吸光度では有意差はなかったが、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.6%および 3%の吸光度の間では有意差があった($p<0.05$)。

表 2 SIRC 細胞を用いた直接細胞接触法における吸光度

	Control	0.003%	0.006%	0.03%	0.06%	0.3%	0.6%	3%
曝露直後 (n=24)	0.5717	0.4853	0.3973	0.3766	0.3463	0.1679	0.0878	0.0434
曝露後 24 時間 (n=12)	0.5470	0.5153	0.4898	0.4304	0.4480	0.1390	0.0220	0.0034

直接細胞接触法を用いて SIRC 細胞に対して過酸化水素を 0.003%～3%の範囲で 10 分間曝露し、曝露直後に MTT アッセイを行った結果得られた吸光度と、曝露後 24 時間通常の培地で培養した後に MTT アッセイを行って得られた吸光度を示す。control は過酸化水素を希釈した滅菌水のみを 10 分間曝露したものを示す。

SIRC 細胞では、過酸化水素曝露直後と曝露後 24 時間培養後のいずれの場合も、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.003%から 0.06%における吸光度に有意差はなかったが、曝露した過酸化水素濃度が 0.3%、0.6%、3%の吸光度は control 群の吸光度と有意差があった($p<0.05$)。

表 3 HDFa 細胞を用いた直接細胞接触法における吸光度

	Control	0.003%	0.006%	0.03%	0.06%	0.3%	0.6%	3%
曝露直後 (n=24)	0.1629	0.1459	0.1441	0.1126	0.0853	0.0327	0.0165	0.0070
曝露後 24 時間 (n=12)	0.2659	0.2338	0.2110	0.1781	0.0782	0.0081	0.0074	0.0057

直接細胞接触法を用いて HDFa 細胞に対して過酸化水素を 0.003%～3%の範囲で 10 分間曝露し、曝露直後に MTT アッセイを行った結果得られた吸光度と、曝露後 24 時間通常の培地で培養した後に MTT アッセイを行って得られた吸光度を示す。control は過酸化水素を希釈した滅菌水のみを 10 分間曝露したものを示す。

HDFa 細胞では、過酸化水素曝露直後および曝露後 24 時間培養後のいずれの場合も、control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.003%から 0.06%における吸光度に有意差はなかったが、曝露した過酸化水素濃度が 0.3%、0.6%、3%の吸光度は control 群の吸光度と有意差があった ($p<0.05$)。

表 4 Caco-2 細胞を用いた直接細胞接触法における吸光度

	Control	0.003%	0.006%	0.03%	0.06%	0.3%	0.6%	3%
曝露直後 (n=24)	0.2339	0.1774	0.1679	0.1557	0.1497	0.0251	0.0051	0.0056
曝露後 24 時間 (n=9)	0.1797	0.1053	0.1110	0.0497	0.0297	0.0300	0.0053	0.0043

直接細胞接触法を用いて Caco-2 細胞に対して過酸化水素を 0.003%～3%の範囲で 10 分間曝露し、曝露直後に MTT アッセイを行った結果得られた吸光度と、曝露後 24 時間通常の培地で培養した後に MTT アッセイを行って得られた吸光度を示す。control は過酸化水素を希釈した滅菌水のみを 10 分間曝露したものを示す。

Caco-2 細胞では、過酸化水素曝露直後の吸光度は control 群と曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 0.06% までは有意差はなく、曝露した過酸化水素濃度が 0.3%、0.6%、3% になると有意差があった ($p<0.05$) が、曝露後 24 時間培養すると、control 群に対して曝露した過酸化水素濃度が 0.003% から 3% まですべての濃度において吸光度に有意差があった ($p<0.05$)。

表 5 HeLa 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法における吸光度

	control	0min	30min
FBS(+) (n=18)	0.1203	0.0967	0.1236
FBS(-) (n=12)	0.1404	0.1321	0.1223

HeLa 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法において、試験片を埋め込んだ後に 10%FBS を含む培地で培養したのちにゲル内の生存した細胞について MTT アッセイを行ったときの吸光度を FBS(+)、試験片を埋め込んだ後に FBS を含まない培地で培養したのちにゲル内の生存した細胞について MTT アッセイを行ったときの吸光度を FBS(-)に示す。

control は、高圧蒸気滅菌したのみで 3%過酸化水素水に浸漬しなかった PTFE チューブ片を埋め込んだ際の吸光度、0min は滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬して風乾せずにゲル内に埋め込んだ際の吸光度、30min は滅菌した PTFE チューブ片を 30%過酸化水素水に 10 分間浸漬したのち、30 分間風乾したものをゲル内に埋め込んだ際の吸光度を示す。

FBS(+)および FBS(-)ともに、control 群の吸光度と 0min 群の吸光度、control 群の吸光度と 30min 群の吸光度の間には有意差はなかった。

表 6 SIRC 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法における吸光度

	control	0min	30min
FBS(+) (n=18)	0.1308	0.0787	0.1403
FBS(-) (n=9)	0.2161	0.1784	0.2088

SIRC 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法において、試験片を埋め込んだ後に 10%FBS を含む培地で培養したのちにゲル内の生存した細胞について MTT アッセイを行ったときの吸光度を FBS(+)、試験片を埋め込んだ後に FBS を含まない培地で培養したのちにゲル内の生存した細胞について MTT アッセイを行ったときの吸光度を FBS(-)に示す。

control は、高圧蒸気滅菌したのみで 3%過酸化水素水に浸漬しなかった PTFE チューブ片を埋め込んだ際の吸光度、0min は滅菌した PTFE チューブ片を 30%過酸化水素水に 10 分間浸漬して風乾せずにゲル内に埋め込んだ際の吸光度、30min は滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬したのち、30 分間風乾したものをゲル内に埋め込んだ際の吸光度を示す。

FBS(+)および FBS(-)ともに、control 群と 0min 群、20min 群のそれぞれの吸光度の間には有意差はなかった。

表 7 Caco-2 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法における吸光度

	control	0min	30min
FBS(+) (n=18)	0.0653	0.0452	0.0675
FBS(-) (n=9)	0.1282	0.1013	0.1357

Caco-2 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法において、試験片を埋め込んだ後に 10%FBS を含む培地で培養したのちにゲル内の生存した細胞について MTT アッセイを行ったときの吸光度を FBS(+), 試験片を埋め込んだ後に FBS を含まない培地で培養したのちにゲル内の生存した細胞について MTT アッセイを行ったときの吸光度を FBS(-)に示す。

control は、高圧蒸気滅菌したのみで 3%過酸化水素水に浸漬しなかった PTFE チューブ片を埋め込んだ際の吸光度、0min は滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素水に 10 分間浸漬して風乾せずにゲル内に埋め込んだ際の吸光度、30min は滅菌した PTFE チューブ片を 30%過酸化水素水に 10 分間浸漬したのち、30 分間風乾したものをゲル内に埋め込んだ際の吸光度を示す。

FBS(+)では、control 群と 0min 群、control 群と 30min 群の吸光度には有意差はなかったが、FBS(-)では control 群と 0min 群の吸光度の間に有意差があった ($p<0.05$)。FBS(-)での control 群と 30min 群の吸光度では有意差はなかった。

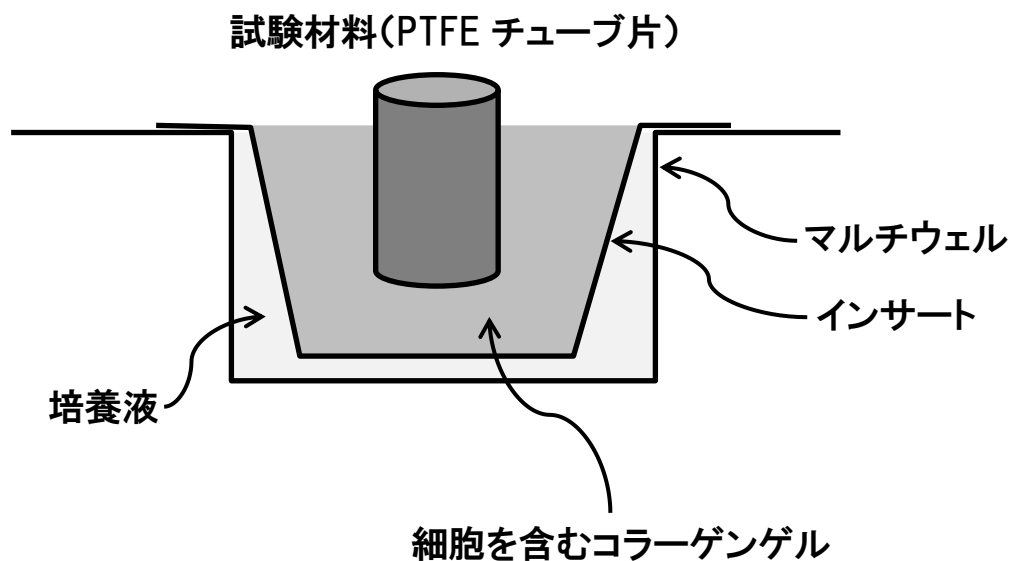


図 1 パーミアブルサポートを用いたコラーゲンゲル包埋培養法

パーミアブルサポート(Transwell® Permeable Supports, Corning)を用いたコラーゲンゲル包埋培養法を示す。

インサート内に HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞の各細胞を 50000 個となるように混和したコラーゲンゲル溶液を加えてマルチウェル内に設置し、5%CO₂・37℃でインキュベーションしてゲル化させた。ゲル化後、マルチウェル内に培養液を加えた。

コラーゲンゲルの中央に、試験片として PTFE チューブ片 (外径 3mm、内径 1mm) を埋め込んだ。

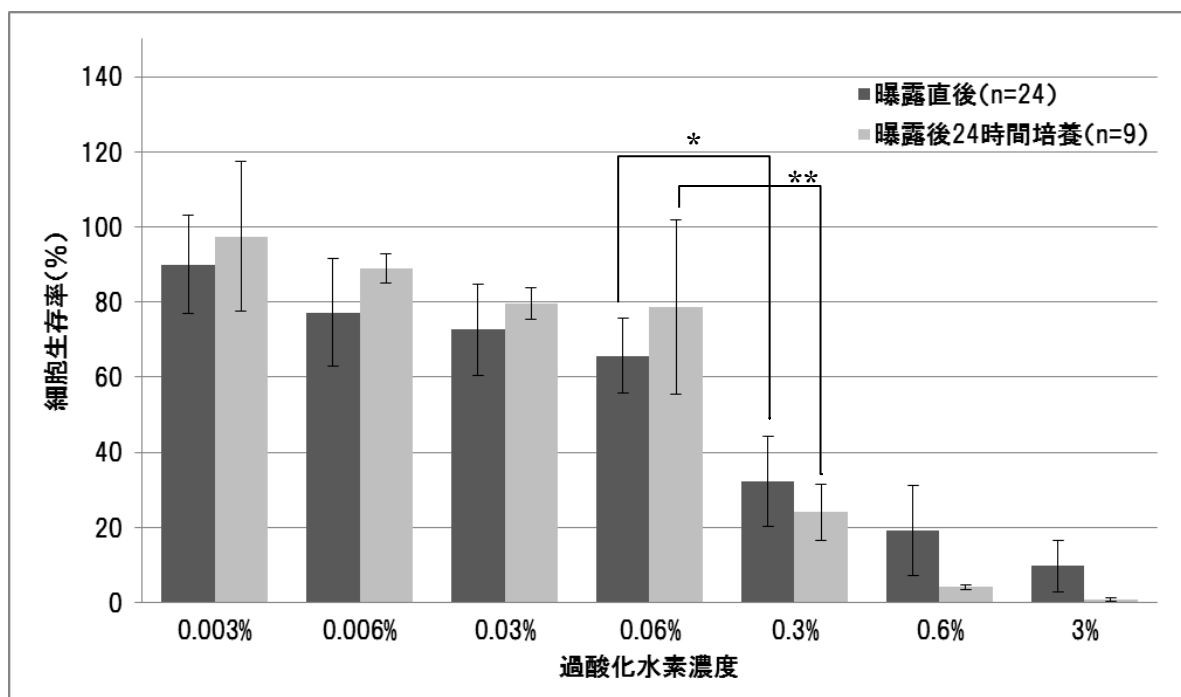


図 2 HeLa 細胞における直接細胞接触法

HeLa 細胞に直接細胞接触法で過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率を示す。

過酸化水素曝露直後では、過酸化水素濃度 0.003%～0.06%の間における細胞生存率の変化に有意差はなかったが、過酸化水素濃度が 0.06%から 0.3%の間で細胞生存率に有意差があった(* $p<0.01$)。

HeLa 細胞に直接細胞接触法で過酸化水素を曝露した後、10%FBS を含む培養液で 24 時間培養した後の細胞生存率の変化も、過酸化水素曝露直後の細胞生存率の変化と同様であった。過酸化水素濃度 0.003%から 0.06%の間で細胞生存率の変化には有意差はなかった。過酸化水素濃度が 0.06%から 0.3%の間で細胞生存率に有意差があった(** $p<0.01$)。

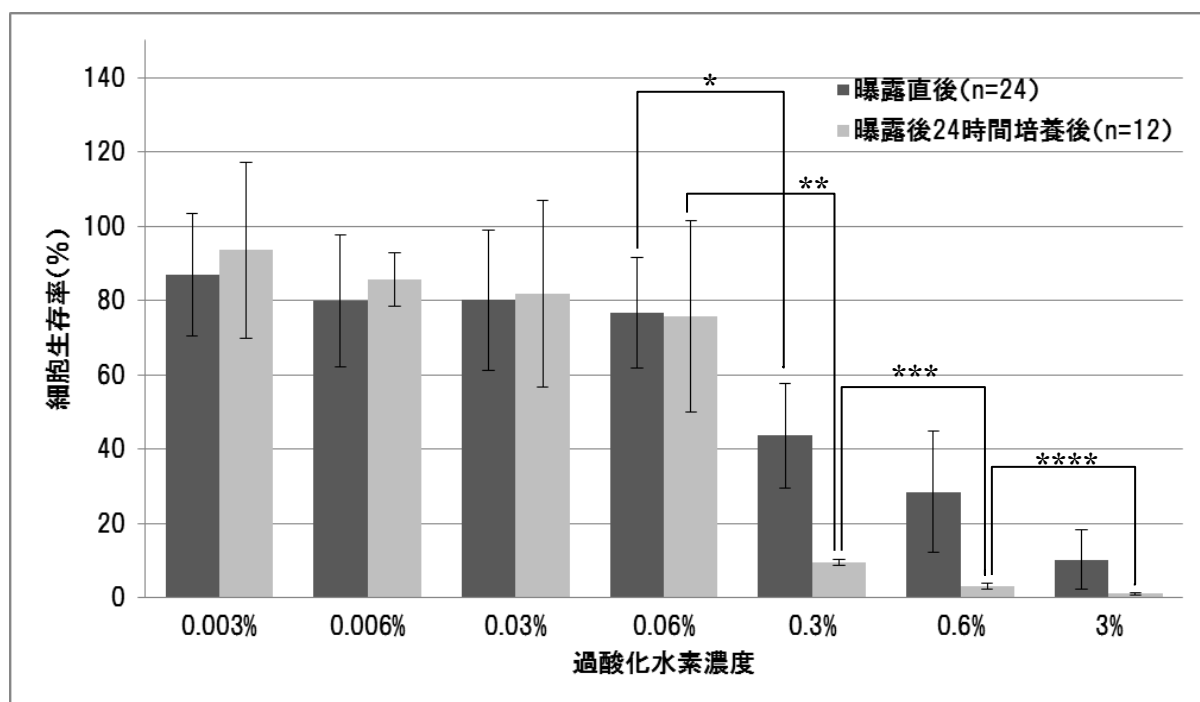


図3 SIRC細胞における直接細胞接触法

SIRC細胞に直接細胞接触法で過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率を示す。

過酸化水素曝露直後では、過酸化水素濃度が0.003%から0.006%の間で細胞生存率は80%前後ではほぼ一定であり、この間において有意差はなかった。過酸化水素濃度が0.06%から0.3%の細胞生存率の変化には有意差があった(* $p<0.01$)。

SIRC細胞に直接細胞接触法で過酸化水素を曝露し、10%FBSを含む培養液で24時間培養した後では、過酸化水素濃度0.003%から0.06%の間では細胞生存率の変化に有意差は認められなかったが、過酸化水素濃度が0.06%から0.3%の間(** $p<0.05$)、0.3%から0.6%の間(***) $p<0.05$)、0.6%から3%の間では有意差があった(**** $p<0.01$)。

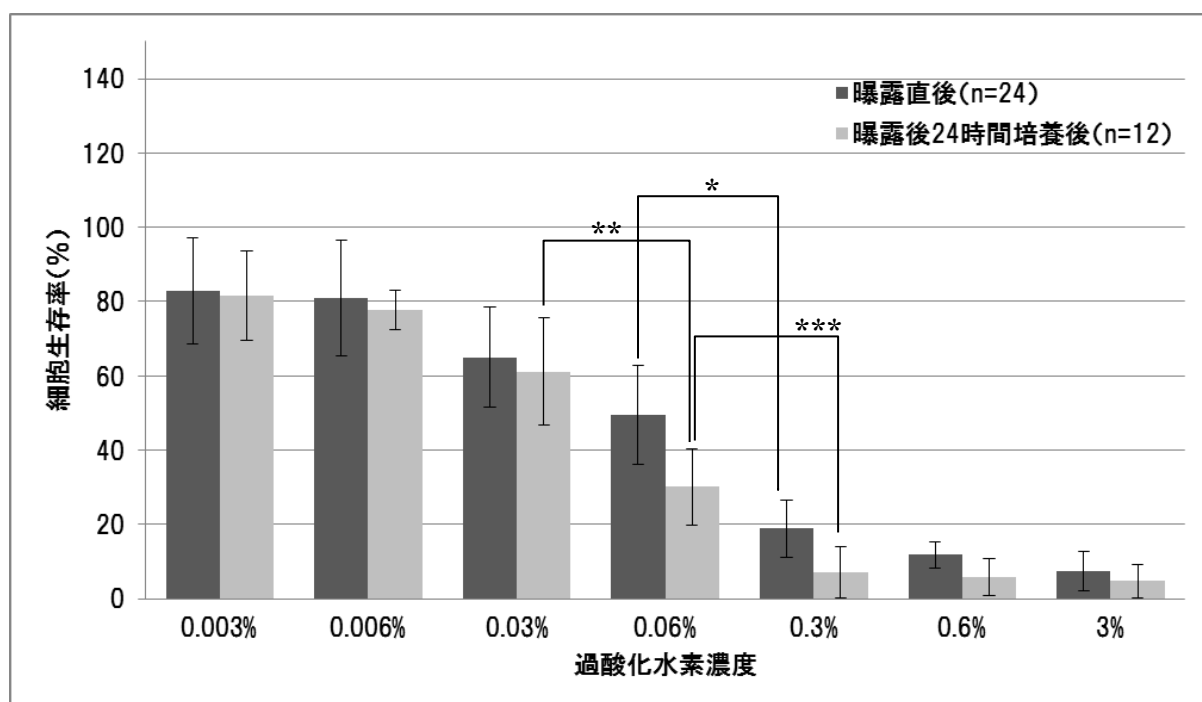


図 4 HDFa 細胞における直接細胞接触法

HDFa 細胞に直接細胞接触法で過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率を示す。

過酸化水素曝露直後の細胞生存率において、過酸化水素濃度 0.003%から 0.06%の間では有意差は見られなかったが、過酸化水素濃度 0.06%から 0.3%の間で有意差があった(* $p<0.01$)。

HDFa 細胞に直接細胞接触法で過酸化水素を曝露した後、10%FBSを含む培養液で24時間培養したときの細胞生存率では、過酸化水素濃度が 0.003%から 0.03%までの間は有意差は認められなかったが、過酸化水素濃度が 0.03%から 0.06%の間(** $p<0.05$)、および 0.06%から 0.3%の間で有意差があった(*** $p<0.05$)。

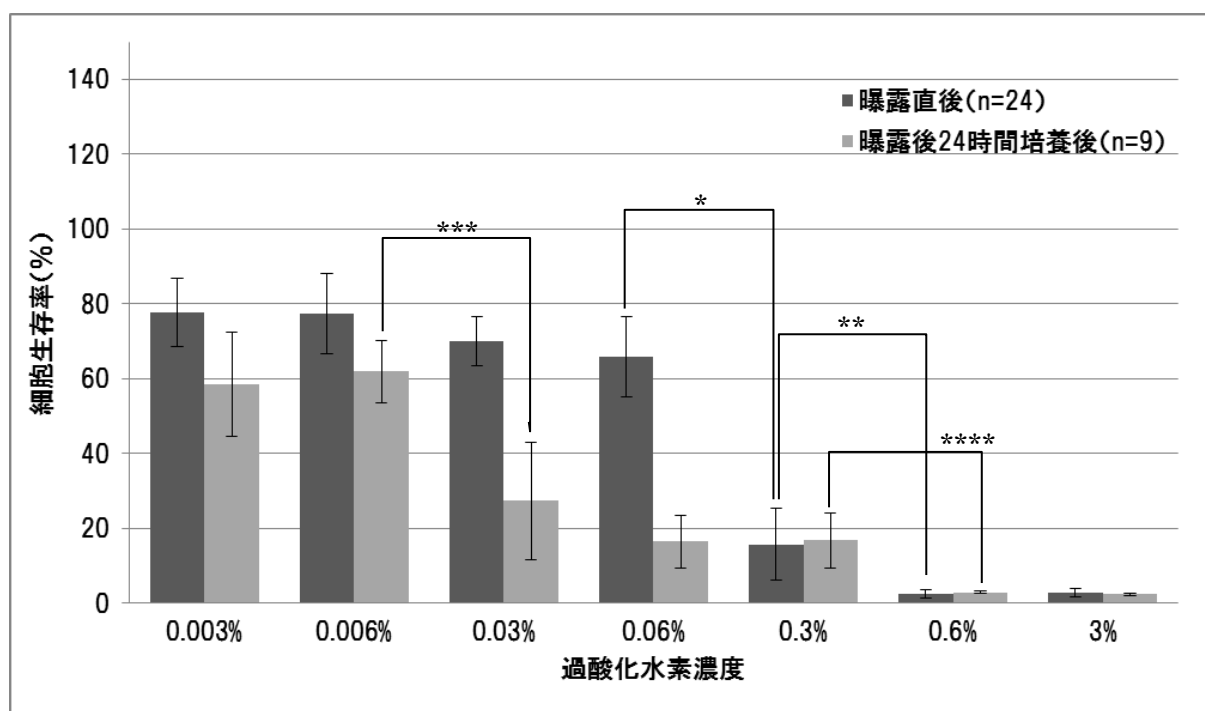


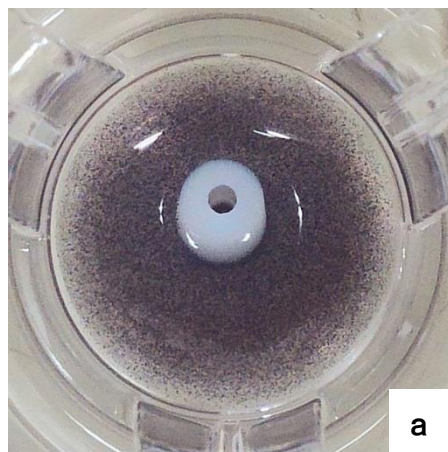
図 5 Caco-2 細胞における直接細胞接触法

Caco-2 細胞に直接細胞接触法で過酸化水素を曝露した直後の細胞生存率を示す。

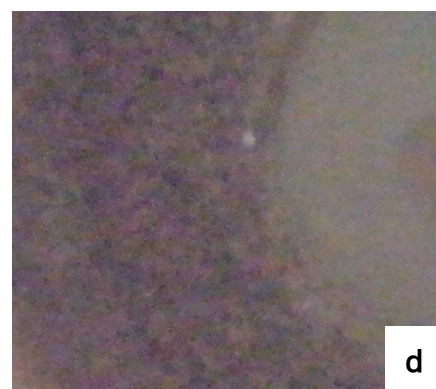
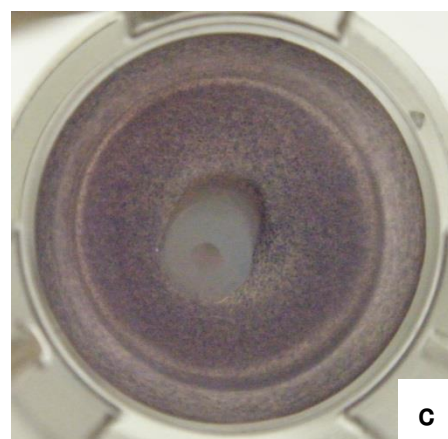
過酸化水素曝露直後の細胞生存率は、過酸化水素濃度 0.003%から 0.06%の間での変化では有意差は認められなかったが、過酸化水素濃度 0.06%から 0.3%の間(* $p<0.01$)と、0.3%と 0.6%の間(** $p<0.05$)で、細胞生存率の変化に有意差があった。

過酸化水素を曝露後、10%FBSを含む培養液で 24 時間培養したときの細胞生存率では、曝露した過酸化水素濃度が 0.003%の段階から、細胞生存率が 60%前後と低い値であった。過酸化水素濃度が 0.006%と 0.03%の間(*** $p<0.05$)と 0.3%から 0.6%の間で有意差があった(**** $p<0.05$)。

HeLa 細胞



SIRC 細胞



Caco-2 細胞

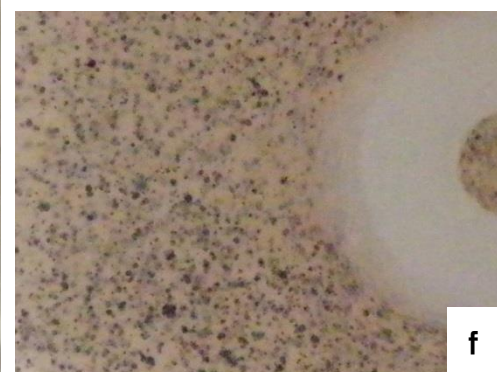
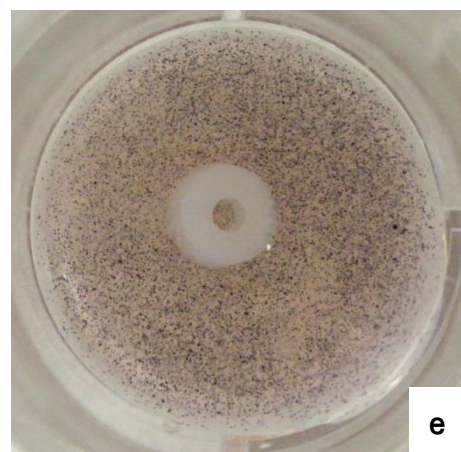
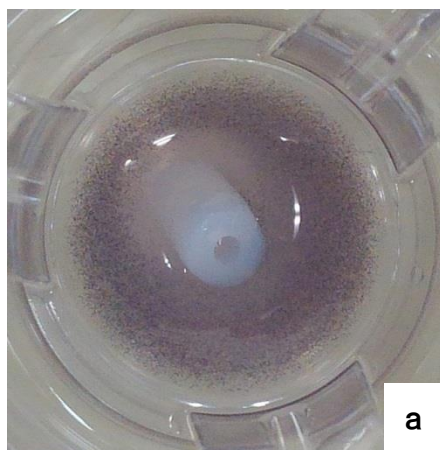


図 6 10%FBS を含む培地で行った過酸化水素未処理試験片のコラーゲンゲル包埋培養法

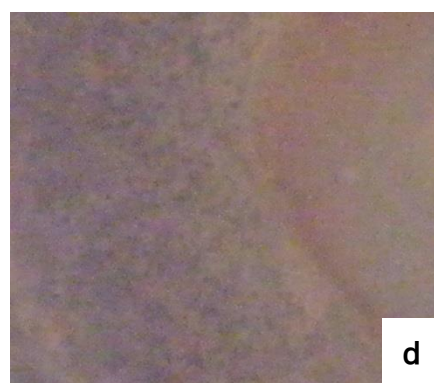
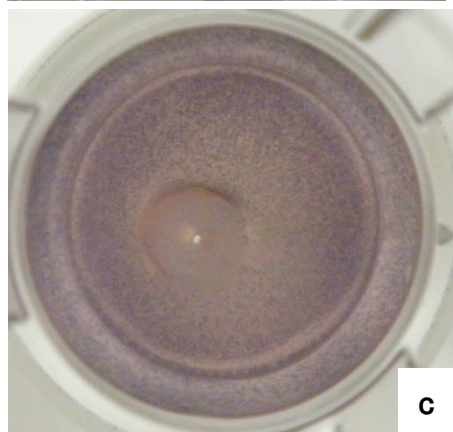
HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に、過酸化水素で処理を施さなかった滅菌 PTFE チューブ片を埋め込み、10%FBS を含む培養液で 24 時間培養すると、ゲル内に包埋された細胞は MTT を取り込みホルマザン色素を生成したことを示す。

いずれの細胞でも、コラーゲンゲル内に均一にホルマザン色素による発色が見られた。また、埋め込まれた PTFE チューブ周辺にもホルマザン色素による発色が見られた。

HeLa 細胞



SIRC 細胞



Caco-2 細胞

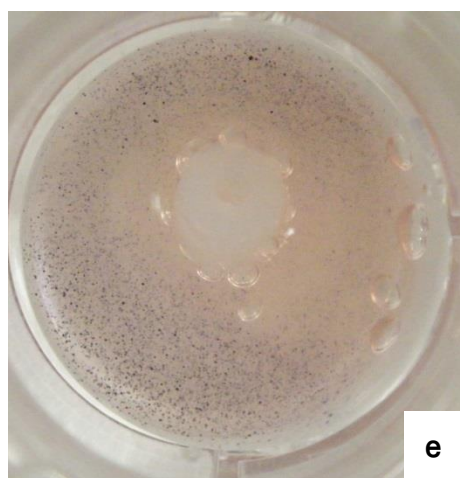
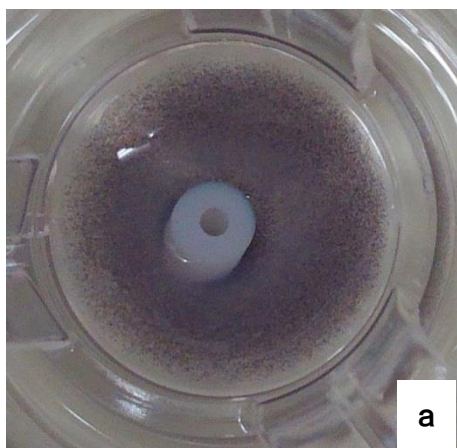


図 7 10%FBS を含む培地で行った過酸化水素処理後風乾しない試験片のコラーゲンゲル包埋培養法

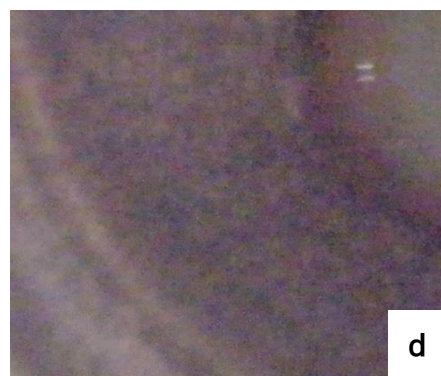
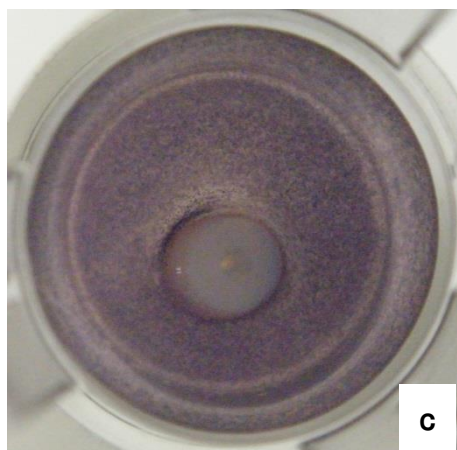
滅菌した PTFE チューブ片を 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬後風乾せずに HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に埋め込み、10%FBS を含む培養液で 24 時間培養したもの。

全ての細胞種において、ゲル内に埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲がホルマザン色素による発色が弱くなっていることを示す。また、処理後の PTFE チューブ片が接触していたゲルの部分は、ホルマザン色素による発色が見られなかった。

HeLa 細胞



SIRC 細胞



Caco-2 細胞

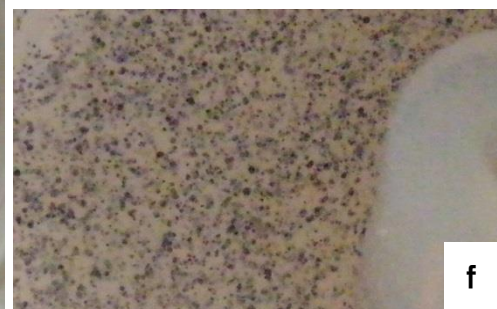
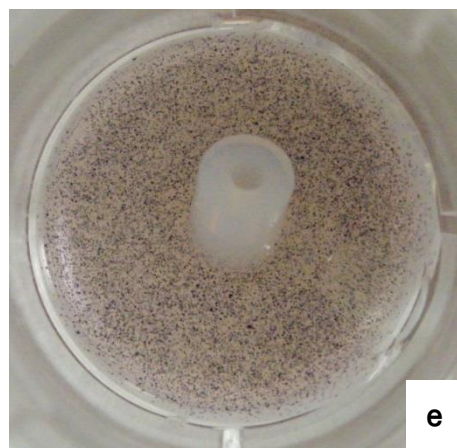
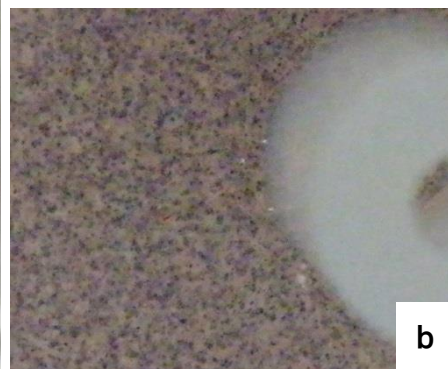
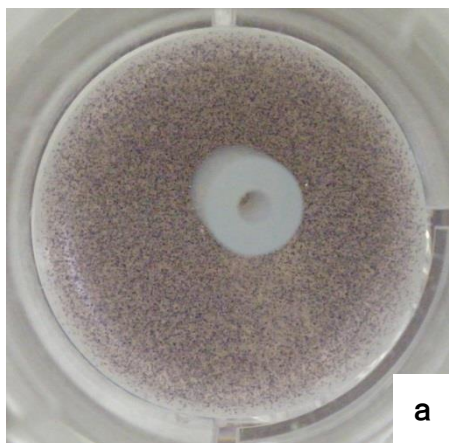


図 8 10%FBS を含む培地で行った過酸化水素処理後風乾した試験片のコラーゲンゲル包埋培養法

滅菌した PTFE チューブ片を 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬後 30 分間風乾したものを、HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に埋め込み、10%FBS を含む培養液で 24 時間培養した結果を示す。

いずれの細胞でも、コラーゲンゲル内に均一に存在するホルマザン色素による発色が見られた。埋め込まれた PTFE チューブ片の周囲やゲルと接触している部分にもホルマザン色素による発色が見られた。

HeLa 細胞



SIRC 細胞



Caco-2 細胞

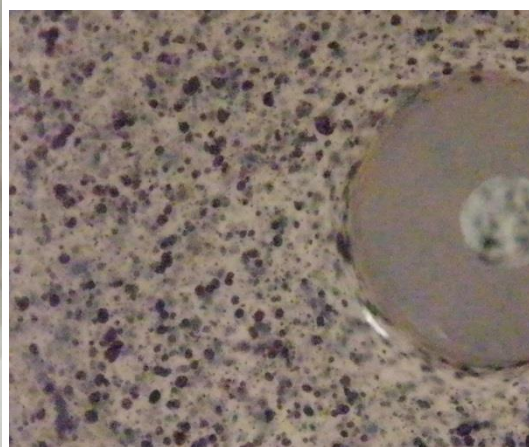
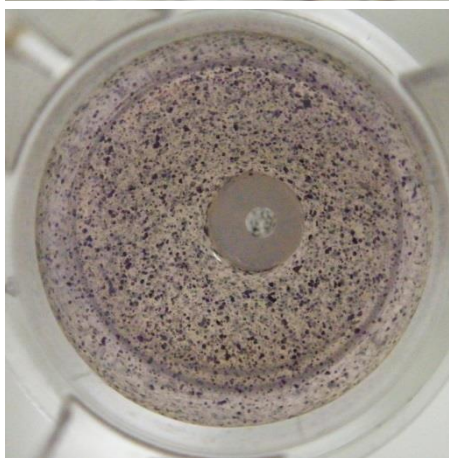


図 9 無血清培地で行った過酸化水素未処理試験片のコラーゲンゲル包埋培養法

滅菌した PTFE チューブ片を過酸化水素に浸漬せずに HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養したのち MTT で生細胞をホルマザン色素で発色させた結果を示す。

いずれの細胞種でも、埋め込んだ PTFE チューブ片の周辺や直接ゲルと接触していた部分でもホルマザン色素による発色が見られた。

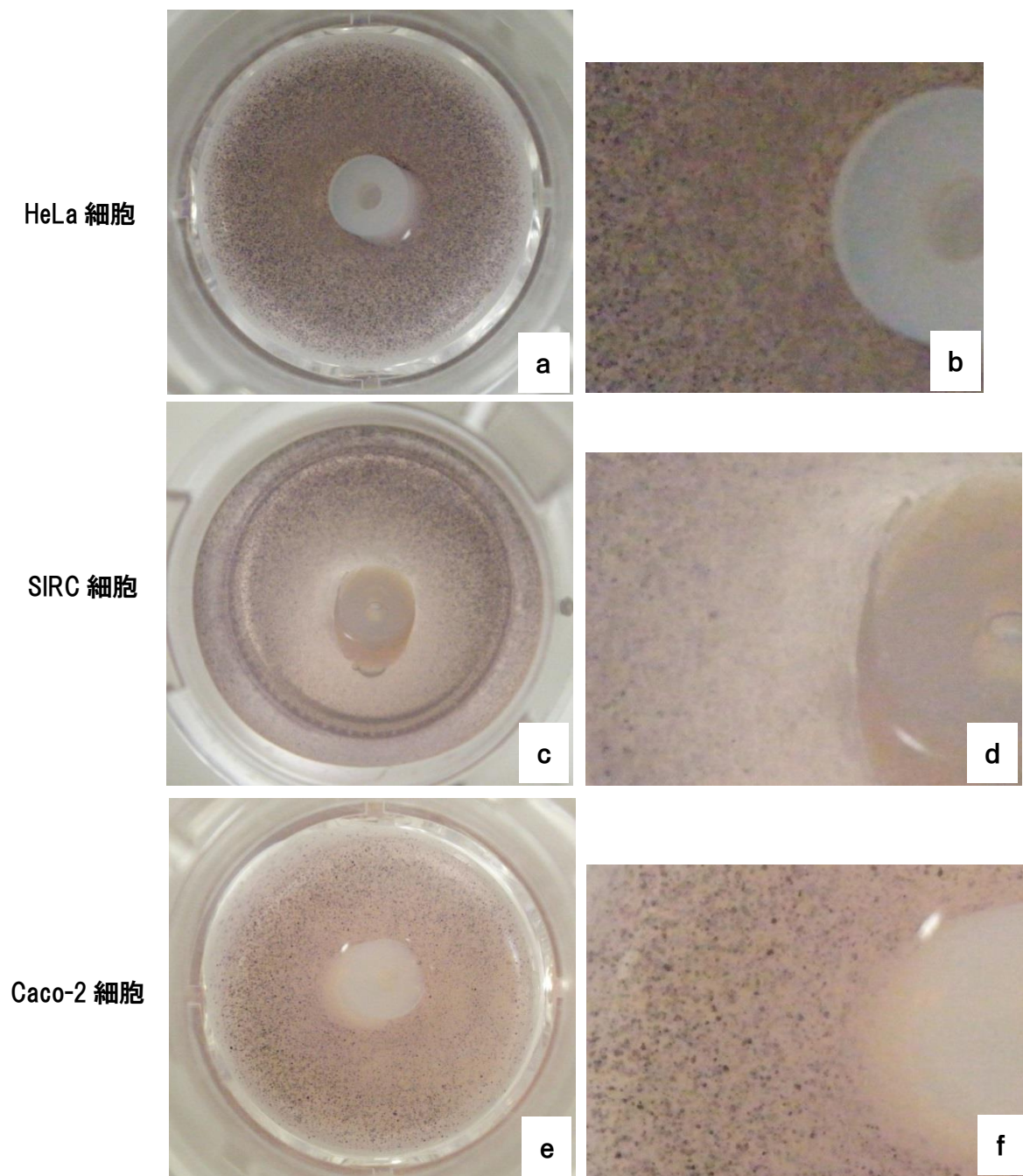
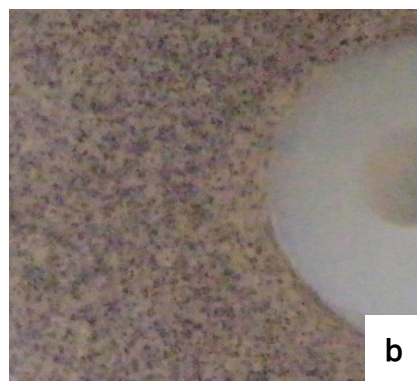
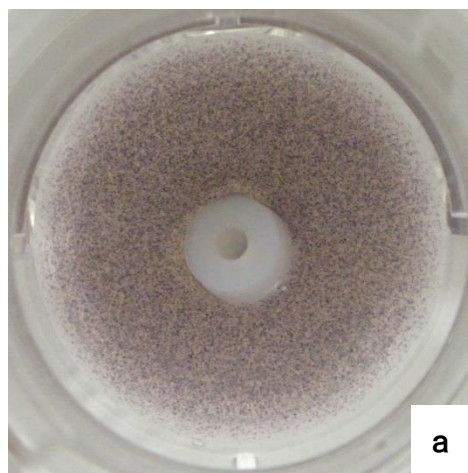


図 10 無血清培地で行った過酸化水素処理後風乾しない試験片のコラーゲンゲル包埋培養法

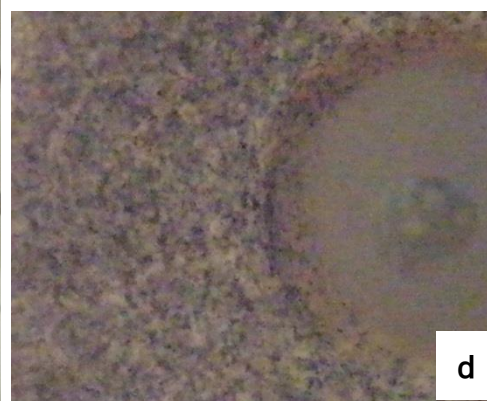
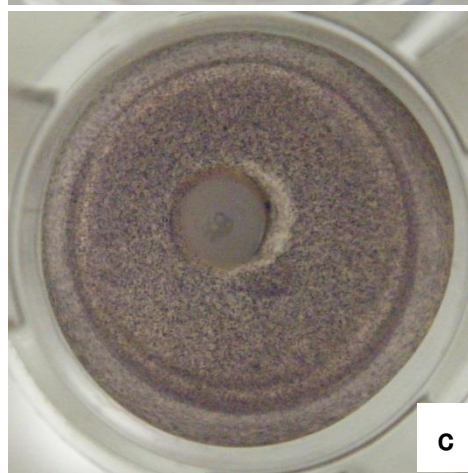
滅菌した PTFE チューブ片を 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬した後、風乾せずに直ちに細胞を包埋したコラーゲンゲル内に埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養したのち、MTT で生細胞を発色させた結果を示す。

SIRC 細胞において、PTFE チューブ片がゲルと接触している部分ではホルマザン色素による発色が見られなかった。Caco-2 細胞では、埋め込まれた PTFE チューブ片がコラーゲンゲルと接触していた部分では、ホルマザン色素による発色が若干見られた。

HeLa 細胞



SIRC 細胞



Caco-2 細胞

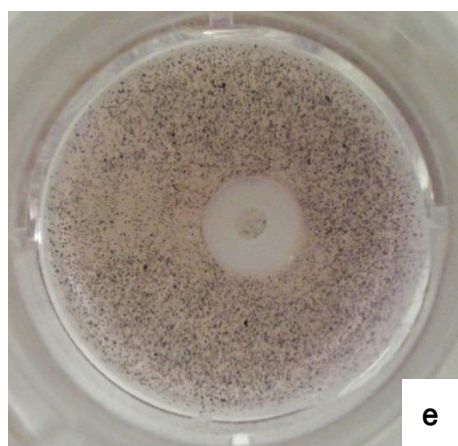


図 11 無血清培地で行った過酸化水素処理後風乾した試験片のコラーゲンゲル包埋培養法

滅菌した PTFE チューブ片を 3% 過酸化水素に 10 分間浸漬し、30 分間風乾して HeLa 細胞、SIRC 細胞、Caco-2 細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に埋め込み、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養したのち MTT で生細胞を発色させた結果を示す。いずれの細胞種においても、埋め込まれた PTFE チューブ片がコラーゲンゲルに接触している部分でもホルマザン色素による発色が見られた。

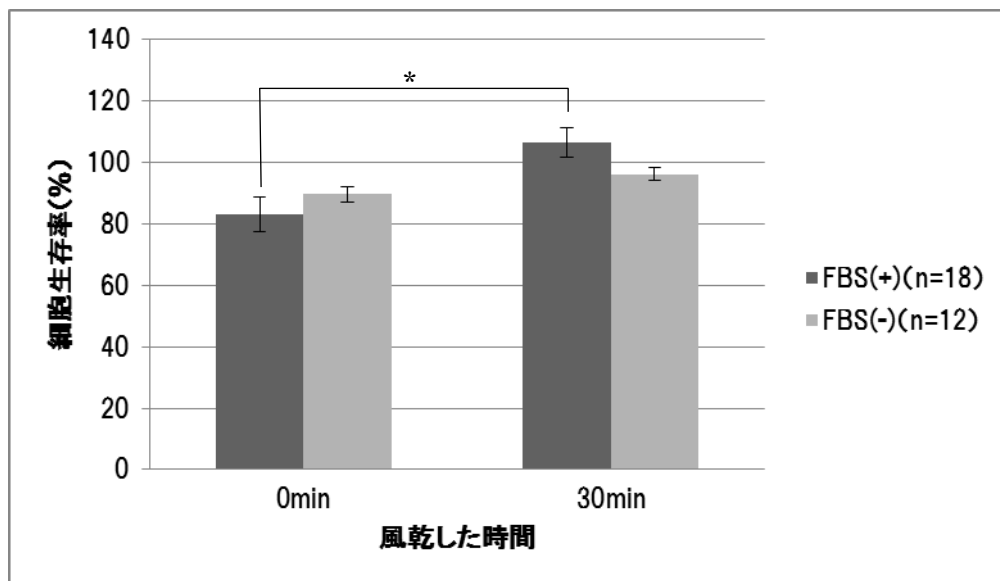


図 12 HeLa 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法における細胞生存率

HeLa 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に過酸化水素で処理を施した滅菌した PTFE チューブ片を埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率を「FBS(+)」、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率を「FBS(-)」に示す。

グラフ中、横軸にある「0min」は滅菌した PTFE チューブ片を 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 0 分群を、「30min」は 30 分間風乾させた 30 分群を表す。

FBS(+)では、0 分群の細胞生存率と 30 分群の細胞生存率では有意差があった(* $p<0.05$)。

FBS(-)では、0 分群は 30 分群の細胞生存率に有意差はなかった。

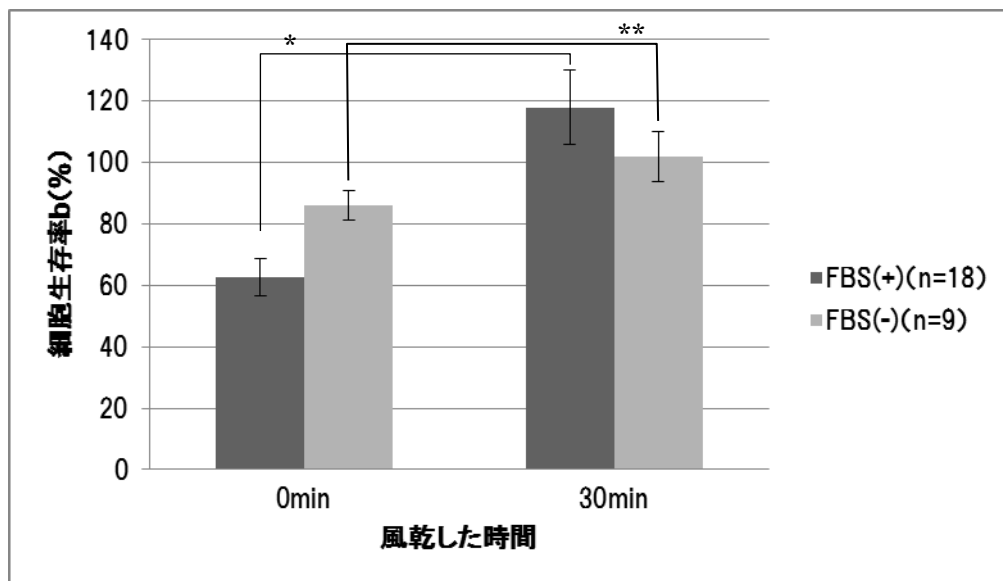


図 13 SIRC 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法における細胞生存率

SIRC 細胞が包埋されたコラーゲンゲル内に過酸化水素で処理を施した PTFE チューブ片を埋め込んで、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率を「FBS(+)」、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率を「FBS(-)」に示す。

グラフ中、横軸に示した「0min」は滅菌した PTFE チューブ片を 3%過酸化水素に 10 分間浸漬し風乾しなかった 0 分群を、「30min」は 30 分間風乾した 30 分群を表す。

FBS(+)では、0 分群では 30 分群よりも有意に細胞生存率が変化していた(* $p<0.01$)。

FBS(-)においても、0 分群と 30 分群の細胞生存率には有意差があった(* $p<0.05$)。

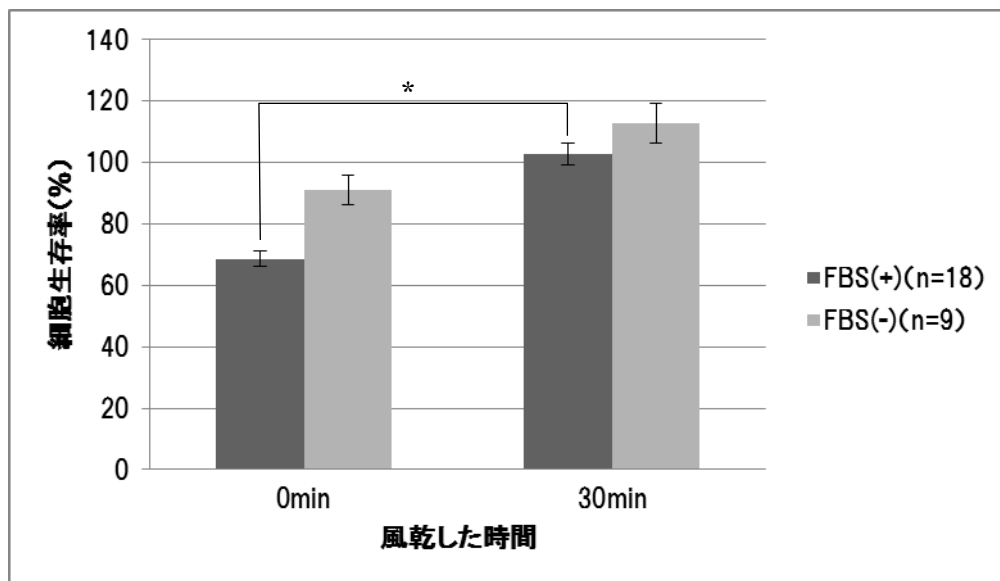


図 14 Caco-2 細胞を用いたコラーゲンゲル包埋培養法における細胞生存率

Caco-2 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に過酸化水素で処理を施した PTFE チューブ片を埋め込み、10%FBS を含む DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率を「FBS(+)」、FBS を含まない DMEM 培地で 24 時間培養した後の細胞生存率を「FBS(-)」に示す。

グラフ中、横軸に示した「0min」は 3%過酸化水素に 10 分間浸漬後、風乾せずに Caco-2 細胞を包埋したコラーゲンゲル内に埋め込んだ 0 分群を、「30min」は 30 分間風乾してコラーゲンゲル内に埋め込んだ 30 分群を表す。

FBS(+)では、0 分群は 30 分群よりも有意に細胞生存率が変化していた(* $p<0.01$)が、FBS(-)では 0 分群と 30 分群の間に有意差はなかった。

Examination of cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured cells

Kaiya Takano

Division of Infection Prevention and control, Tokyo Healthcare University Postgraduate School

Introduction: In recent years, hydrogen peroxide is used to sterilize medical instruments as hydrogen peroxide gas plasma sterilisation. However, during the running sterilization, hydrogen peroxide diffuses into the surrounding. Then, after sterilization, hydrogen peroxide remaining on the surface of the sterilized device. Hydrogen peroxide breaks down into water and oxygen but is highly toxic before the breakdown due to its strong oxidative effect. It is necessary to examine how hydrogen peroxide as a sterilizing agent affects cells so that its effect on the human body can be investigated.

Objective: The direct contact method was used to directly expose cultured cells to hydrogen peroxide, and the effects on cells were examined. In addition, the collagen gel cell culture method was used to examine how cells are affected by their contact with an object which had been soaked in hydrogen peroxide.

Methods: This study evaluated cytotoxicity of hydrogen peroxide in commonly used HeLa cells, corneal-derived cells (SIRC cells), HDFa cells derived from dermal fibroblasts, and Caco-2 cells derived from intestinal mucosal epithelial cells. The direct contact method was used to directly expose cultured cells without the addition of hydrogen peroxide to the culture fluid. The cells were exposed to hydrogen peroxide in the concentration range of 0.003% - 3% for 10 minutes, and then the cell viability was determined. In addition, the collagen gel culture method was used in which the HeLa cells, SIRC cells, and Caco-2 cells were embedded in collagen gels. A piece of Teflon tube which had been soaked in hydrogen peroxide was embedded in collagen gel and allowed to contact the cells. The viability was determined for cells embedded in the gel.

Results: When the direct contact method was used with hydrogen peroxide concentrations of 0.3% or more, the cell viability was reduced to 50% or less for all cells. When the hydrogen peroxide concentrations were increased, the cell viability decreased in a concentration-dependent manner. The concentration-dependent viability tended to decrease more in HeLa cells and HDFa cells than in SIRC cells and Caco-2 cells. In the collagen gel culture method, cells did not survive in the gel when the cells were in contact with the Teflon tube, which had been embedded in the gel immediately after soaking for 10 minutes in a 3% hydrogen peroxide solution. However, cells survived in the gel when the cells were in contact with the Teflon tube, which had been embedded after soaking in hydrogen peroxide and then air dried for 30 minutes.

Conclusions: By the direct contact method, we found that hydrogen peroxide had caused a reduction acts in cell viability directly to the cell. In addition, the effect of hydrogen peroxide differed by cell type. When the collagen gel culture method was used, the cells were affected by direct contact with an object which had been soaked in hydrogen peroxide. The results of this study suggest that an evaluation can be performed on how hydrogen peroxide on sterilized instruments and gaseous hydrogen peroxide affect cells.