

滅菌後ハイブリッド材料の血管内皮細胞生着能力の調査

The Study of Ability for Blood Vessel Endothelium Survival of the Hybrid Material after Sterilization

田代彩夏(北里大) 井上雄介(東北大) 川瀬由季乃(北里大) 磯山隆(東大)

斎藤逸郎(東大) 小野俊哉(東大) 原伸太郎(東大) 塚本晃海(東大) 李欣陽(東大)

村上遥(東大) 前野映里奈(北里大) 熊谷寛(北里大) 阿部裕輔(東大)

Ayaka TASHIRO, Kitasato University
 Yusuke INOUE, Tohoku University
 Yukino KAWASE, Kitasato University
 Takashi ISOYAMA, The University of Tokyo
 Itsuro SAITO, The University of Tokyo
 Toshiya ONO, The University of Tokyo
 Shintaro HARA, The University of Tokyo
 Terumi YURIMOTO, The University of Tokyo
 XinYang LI, The University of Tokyo
 Haruka MURAKAMI, The University of Tokyo
 Erina MAENO, Kitasato University
 Hiroshi KUMAGAI, Kitasato University
 Yusuke ABE, The University of Tokyo

Abstract: The purpose of this study is to establish sterilization method of the hybrid material which is new medical material that let scaffold of artificial materials fuse with biotissue in the body. The sterilization methods are autoclave, dry heat, EOG, hydrogen peroxide gas plasma, and gamma beam sterilization. Hybrid material was freeze-dried and be sterilized. In addition, one sample into the saline are made that sterilized by gamma beam without freeze drying. In total, six kinds of samples are made. And then we observed physical shape and structural change using FE-SEM. Furthermore, we have cultured the vascular endothelial cell on the materials to check biocompatibility and cell adhesive property. The number of cell engrafted on hybrid material was counted by DAPI stain. As a result, Gamma beam sterilization without freeze dry showed the best result.

Key Words: Artificial material, Biomaterial, Scaffold, Sterilization, Cell culture

1. 背景

現在、臨床の場で用いられている医療材料は、人工材料と生体材料の2つに大きく分けられる⁽¹⁾。人工材料は強度に優れるが、生体適合性に難が残ると言われており、例えば人工材料で作製された脱血カニューレの場合、生体適合性が悪く周りの組織と結合しないため、カニューレと組織との間に隙間ができてしまい、そこに血液が入り込み血栓が形成されることがある⁽²⁾。このVADのカニューレ周囲に形成される血栓を防止するために、人工材料の中でも生体適合性に優れたチタンをメッシュ状に加工し、周囲の心筋組織と癒合させる脱血カニューレの研究などが行われてきた。一方、生体材料は材料の強度が問題であり、例えば生体弁の場合、経年劣化による弁の交換が必要となる。

当研究室で開発したハイブリッド材料⁽³⁾は、人工材料と生体由来材料を組み合わせることで、人工材料の強度という長所と、生体由来材料の生体適合性という長所を併せ持つ新たな医療材料のことである。Fig. 1に示すように、組織新生の足場となる人工材料を皮下に埋め込むと、カプセル化により人工材料と生体組織が一体化したものを得ることができる。これを免疫拒絶反応を抑えるために脱細胞処理を行ったものがハイブリッド材料であり、血液接触面に再埋め込みを行うことで、優れた生体適合性を示す。これ

までの研究では、補助人工心臓用のハイブリッド脱血カニューレを作成し、左心バイパスによる慢性動物実験を行った結果、93日目に摘出した脱血カニューレは周囲に血栓は無く、周囲の心筋組織となめらかにと癒合し、上皮化も良好であった⁽⁴⁾。

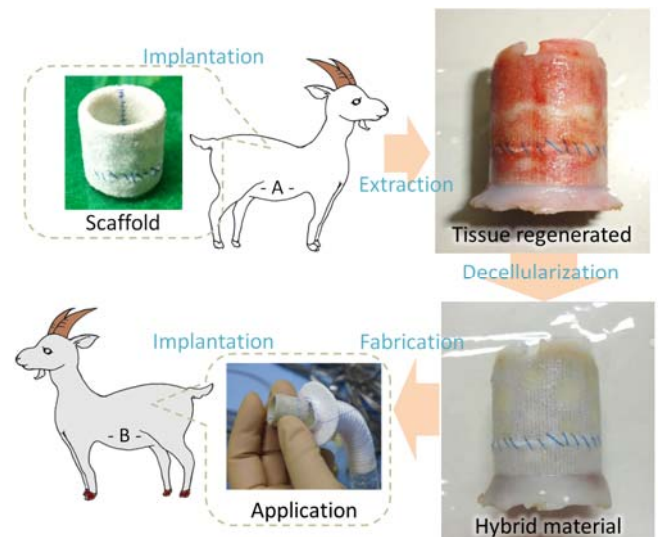


Fig.1 Concept and application of hybrid material

このハイブリッド材料における喫緊の課題として、滅菌方法が確立されていないことが挙げられる。優れた医療材料を市販する際に、無菌操作で取り扱う事に加えて、滅菌方法を確立することは大変重要である。一般に、生体材料の滅菌は材料に与える影響が大きいとされている⁽⁵⁻⁶⁾。また、医療現場で選択されている滅菌方法は多数あるが、全く新しい医療材料であるハイブリッド材料に対してどの方法が適当であるかは、まったく不明である。本研究の目的は、ハイブリッド材料の滅菌方法の確立である。

2. 実験方法

2-1 ハイブリッド材料の作製

本研究では、生体組織を新生・誘導し、定着させるための足場として、これまで研究実績のあるポリエステル起毛繊維を使用した。準備した材料は、直径 15mm 厚さ 1mm の円状に成型した足場である(Fig.1-A)。これを 4 枚 1 組としてアクリルの外型へ封入した。外型は上下 2 つのパーツで構成した。足場に接触する最も薄いアクリル部分の厚さが 0.6mm、縦 35mm、横 35mm のシート状のデバイスとした。デバイス 1 枚につき 4 つのポリエステルベロア足場をはめ込む場所を作製した。シートを内挿する端部とデバイスの中央部分にそれぞれ細胞・組織を誘導するための孔を設けた。外型の材料としては加工性、耐衝撃性に優れた生体適合性も高いことから、アクリル樹脂を用いた(Fig.2-B)。この埋め込みデバイスをヤギの皮下へ埋込を行った。デバイスを広背筋上に縫い付け固定した(Fig.2-C)。約 3 ヶ月(89 日間)の埋込後にデバイスを摘出し、計 128 個のサンプルを得た(Fig.2-D)。

取り出し後、サンプルを脱細胞処理するために、1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液中へ 6 時間攪拌暴露し、その後生理食塩水を用いてリンスを 3 日間実施した(Fig.2-E)。

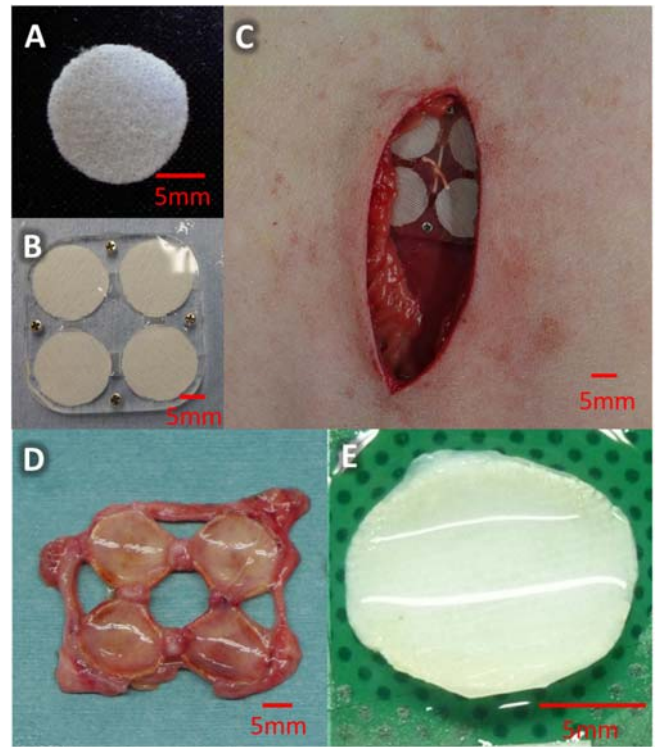
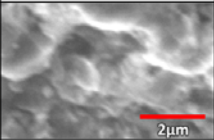
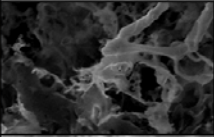
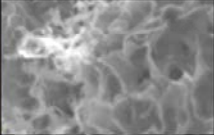
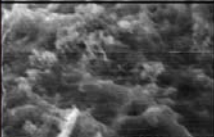
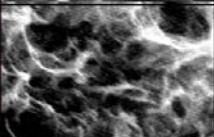


Fig.2 Manufacture of the hybrid material (A: Scaffolding of the polyester velour, B: Device assembling, C: Implantation of the hybrid material, D: After extract, E: After decellularization, Hybrid material completion)

2-2 ハイブリッド材料の滅菌

脱細胞後に得られたハイブリッド材料に対して最適な滅菌方法を調査するために選んだ滅菌方法は、オートクレー

Table1. Summary of sterilization

Name	Mechanism	Result		
		Comment	Photo	SEM
Autoclave	Heat High pressure steam	×	Change color Decrease of mesh structure Increase of fiber diameter	
Dry heat	Heat Drying	○	Change color Decrease of mesh structure	
Ethylene oxide gas	Toxicity of ethylene oxide	△	Unchanged	
Hydrogen peroxide gas plasma	Ultraviolet rays Free radical	×	Constriction of sample Decrease of mesh structure Increase of fiber diameter	
Gamma beam	Ionization Excitation action	○	Unchanged	

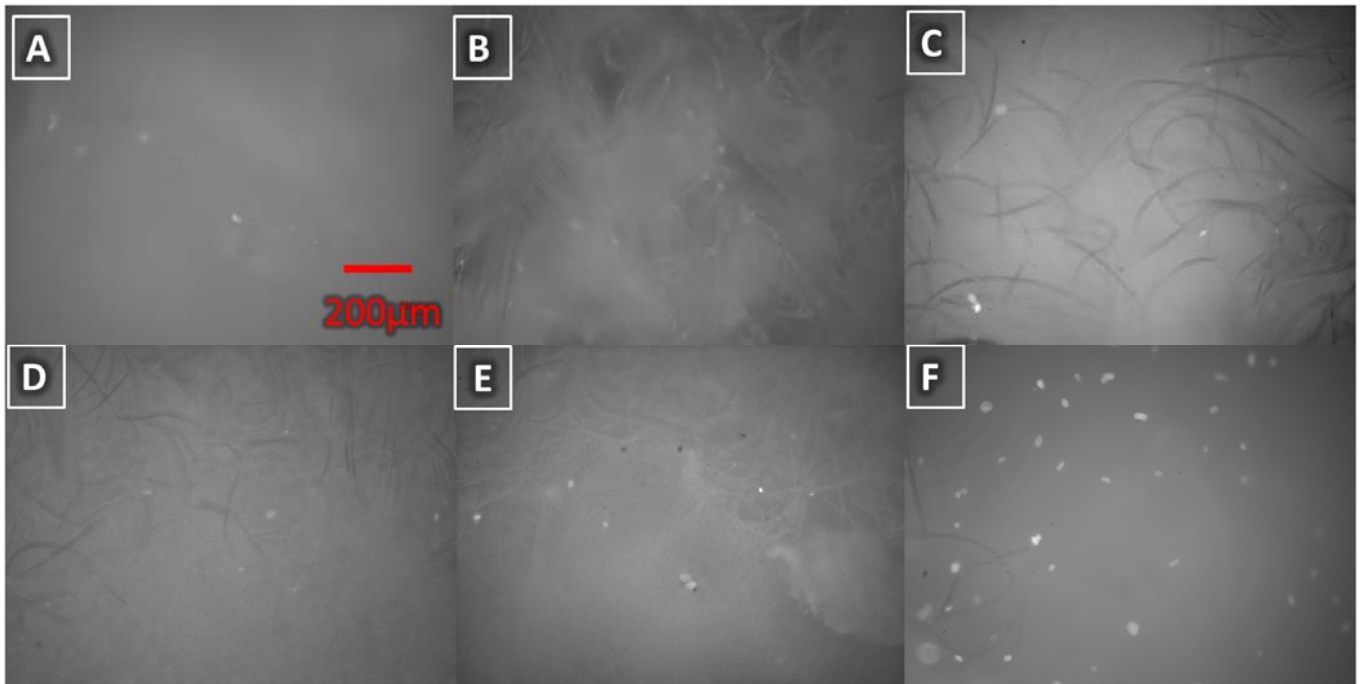


Fig.3 DAPI stain image of the hybrid material after cell culture (A: Autoclave, B: Dry heat sterilization, C: EOG sterilization, D: Hydrogen peroxide gas plasma sterilization, E: Gamma beam sterilization, F: Gamma beam sterilization without lyophilization)

ブ滅菌・乾熱滅菌・EOG滅菌・過酸化水素プラズマ滅菌・ガンマ線の滅菌 5 種類⁽⁷⁾である。これらの方法は乾燥状態のものを対象とした滅菌方法であるため、滅菌前に凍結乾燥処理を施した。凍結乾燥処理実施せず生理食塩水に浸した状態でのガンマ線滅菌も実施し、計 6 種類の滅菌サンプルを作製した。オートクレーブは 121 で 20 分実施(TA-33E, 東邦製作所)し、乾熱滅菌は 160 で 120 分(SH62, ヤマト科学), EOG 滅菌は 37 で 120 分(SA-N54, 徳島医療器), 過酸化水素ガスプラズマ滅菌は 45 で 45 分(ステラッド®50, ジョンソン・エンド・ジョンソン), ガンマ線滅菌は 25kGy の照射(コーガアイソトープ)を行った。

2-3 ハイブリッド材料の構造変化の比較

滅菌前後の物理的性状・構造変化を、電界放射型走査電子顕微鏡(FE-SEM)(S2250N 日立ハイテク)を用いて観察、比較した。倍率は 1000 倍とし、20kV の加速電圧を加え、徐々に放出電流を上げ 120 μ A にした後、焦点とコントラスト、明るさを調節しながら、最も鮮明な像が得られたところで、撮影を行った。

2-4 ハイブリッド材料上での細胞培養

ウシ由来血管内皮細胞(BAE-1)を滅菌後の材料で培養し、細胞の生着や増殖を観察し、ハイブリッド材料の生体適合性を調べた。滅菌後のハイブリッド材料上へ血管内皮細胞懸濁液(5×10^6 個)を滴下することを 2 日間で 2 回繰り返し、その後 3 日間シャーレ上で培養した。培養後、試料をホルマリンバッファ(10%)を用いて化学固定し、DAPI 染色(同仁化学研究, BS04)を行い、蛍光顕微鏡(BZ-9000, キーエンス, 日本)で観察、生着細胞数を計測した。

3. 結果

3-1 ハイブリッド材料の作製結果

埋め込みから 89 日後に、デバイスの取り出しを行った。すべての足場材料は、細胞誘導孔から組織が新生され、ペロア全体のハイブリッド化が完了していることが確認でき

た(Fig.2-D)。1%ドデシル硫酸ナトリウム水溶液中へ 6 時間攪拌暴露し、その後生理食塩水を用いてリンスを 3 日間実施した結果、完全に脱細胞化されたハイブリッド材料を得た(Fig.2-E)。これらのシートを使って各評価を行っていくことにした。

3-2 ハイブリッド材料の構造変化の比較

オートクレーブ滅菌後の試料を SEM 観察したところ、脱細胞後に残った細胞外マトリックスの網目構造を確認できる部分が少なく、表面には凹凸が多く見られた。網目構造が維持されている場所でも組織の繊維径が太くなっている様子が確認された。乾熱滅菌後の試料は、網目構造を確認できる場所と、空乏のない均一表面な構造の場所とが入り交じっていた。網目構造を残している場所の繊維径は滅菌前と大きな変化は見られなかった。EOG 滅菌後の試料は変化が見られず、滅菌前と同様の細い繊維径をもつ網目構造が確認された。過酸化水素ガスプラズマ滅菌後の試料は、網目構造を確認できる部分が少なく、表面には凹凸が多く見られた。網目構造が残存している場所のコラーゲンの繊維径が太く変化していた。ガンマ線滅菌後の試料は変化が見られず、滅菌前と同様の細い繊維径をもつ網目構造が確認された。

3-3 ハイブリッド材料上での細胞培養

DAPI 染色の結果、6 種類すべての滅菌後の試料上で、血管内皮細胞の核が確認された(Fig.3)。凍結乾燥処理を施さないでガンマ線滅菌を実施したハイブリッド材料の中では、乾熱滅菌を実施した試料に細胞は多く生着していた。それ以外の滅菌方法では、血管内皮細胞はごく少量しか試料表面上に生着していなかった。6 種類すべての滅菌方法のなかでは、凍結乾燥処理を施さないでガンマ線滅菌を実施したハイブリッド材料に、血管内皮細胞が多数生着していた。

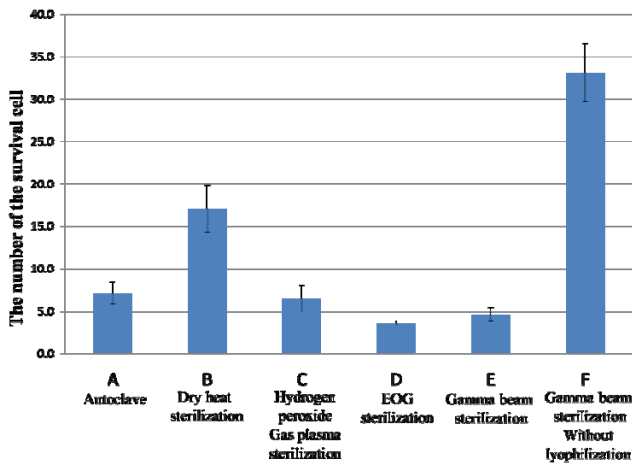


Fig.4 The number of blood vessel endothelium survival around 1mm² (A: Autoclave, B: Dry heat sterilization, C: EOG sterilization, D: Hydrogen peroxide gas plasma sterilization, E: Gamma beam sterilization, F: Gamma beam sterilization without lyophilization)

細胞培養において、もっとも血管内皮細胞が生着したのは、凍結乾燥処理を施さないガンマ線滅菌を行ったハイブリッド材料だった(Fig.4)

4. 考察

構造変化の比較において、オートクレーブ・乾熱滅菌での網目構造の変形は熱によるものと考えられた6つの滅菌方法のうち、滅菌前後で最も構造が変化していたのはプラズマ滅菌だった。これは、過酸化水素から発生したフリーラジカルによって試料が著しく酸化されたため、網目構造の破壊や変形が起きたと考えられる。

細胞培養において、もっとも良好な結果を示したのは凍結乾燥を実施しないガンマ線滅菌、次いで乾熱滅菌だった。乾熱滅菌の結果が良好だったのは、滅菌によって試料表面が適度に収縮し、細胞が生着するのに適した構造になったためと考えられる。凍結乾燥を実施しないガンマ線滅菌の試料にもっとも細胞が生着したのは、他の滅菌方法の場合、凍結乾燥を実施したことにより、試料の細胞接着性に影響が出たためと考えられる。

5. 結論

本研究ではハイブリッド材料の滅菌方法について検討した。SEM 観察において、滅菌前後で試料の物理的形状・構造変化が少なかったのは EOG とガンマ線滅菌をおこなった試料だった。細胞培養において凍結乾燥を実施しないガンマ線滅菌が最も良好な結果を示した。

参考文献

- (1) M. Geethaa, A.K. Singhb, R. Asokamania, A.K. Gogiac. "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants- a review." *Progress in Materials Science* 54,3, pp.397-425 (2009)
- (2) Yumiko Miyake, Kenichi Sugioka, Christine D Bussey, Marco Di Tullio, Shunichi Homma. "Left Ventricular Mobile Thrombus Associated With Ventricular Assist Device-Diagnosis by Transesophageal Echocardiography." *Circulation Journal* 68,4, pp.383-384(2004)
- (3) Kishi A, Isoyama T, Saito I, Miura H, Nakagawa H, Kouno

- A, et al: Use of in vivo insert molding to form a jellyfish valve leaflet. *Artificial Organs* 34, pp.1125-1131(2010)
- (4) 川瀬由季乃:「優れた生体適合性と十分な剛性を併せ持つハイブリッド型補助人工心臓用脱血カニューレの開発」, 北里大学大学院医療系研究科修士論文 (2015)
- (5) Marreco, Paula Rulf, et al. "Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties, and cytotoxicity of chitosan membranes used as wound dressings." *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 71,2, pp.268-277(2004)
- (6) Ernst Magnus Noaha, Jingsong Chena, Xiangyang Jiaoa, Ingo Heschelb, Nobert Pallua. "Impact of sterilization on the porous design and cell behavior in collagen sponges prepared for tissue engineering." *Biomaterials* 23,14, pp.2855-2861(2002)
- (7) 釘宮豊城:「ME の基礎知識と安全管理(改訂第 4 版)」,(株)南江堂, pp.385-390(2002)