

## 医療用ハイブリッド材料の滅菌に関する研究

## Study of Sterilization for Medical Hybrid Material

○ 井上雄介 (東北大)      田代彩夏 (北里大)      磯山隆 (東大)      斎藤逸郎 (東大)  
阿部裕輔 (東大)      白石泰之 (東北大)      山田昭博 (東北大)      坪子 侑佑 (東北大)  
原伸太郎 (東大)      塚本晃海 (東大)      三浦英和 (鈴鹿医療大)      山家智之 (東北大)

Yusuke INOUE, Tohoku University  
Ayaka TASHIRO, Kitasato University  
Takashi ISOYAMA, The University of Tokyo  
Itsuro SAITO, The University of Tokyo  
Yusuke ABE, The University of Tokyo  
Yasuyuki SHIRAIISHI, Tohoku University  
Akihiro YAMADA, Tohoku University  
Yusuke TSUBOKO, Tohoku University  
Shintaro HARA, The University of Tokyo  
Terumi YURIMOTO, The University of Tokyo  
Hidekazu MIURA, Suzuka University of Medical Science  
Tomoyuki YAMBE, Tohoku University

**Abstract:** The purpose of this study is to establish sterilization method of the hybrid material which is new medical materials 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 with DAPI stain. As a result, Gamma beam sterilization without freeze drying showed the best result.

**Key Words:** Medical material, Bio-material, Sterilization, Bio-tissue, Scaffold

## 1. はじめに

### 1.1 背景

現在, 臨床の場で用いられている医療材料には, その組成で分類すると人工材料と生体由来材料とに分けられる<sup>(1-6)</sup>. 人工材料は強度と加工性に優れるが, 抗血栓性や, 細胞親和性などの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<sup>(7-9)</sup>. 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<sup>(10-12)</sup>. 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.

### 1.2 ハイブリッド材料

人工材料は金属や高分子材料を原料とし, 高い加工性能と高い工場強度を有しているが, 前述のように生体適合性は十分でなく, 血液接触面での使用には解決すべき課題として残されている. 生体由来材料はブタやウシ<sup>(13-14)</sup>などの動物の生体組織を原料とし, 化学固定や脱細胞処理を施し, 免疫抑制反応を低減させる処理を施した上で利用される. 生体由来材料は高い生体適合性, 血液適合性を示すものが多いが, 機械的強度に課題が残されており, 人工血管とし

て動脈圧下で適用した場合には, 内圧に耐えられず径の拡張や, 断裂等に由来する内膜肥厚などが生じる恐れがあるとされている. そこで我々は, 生体由来材料の生体適合性と, 人工材料の強度を併せ持つハイブリッド人工材料の開発を行っている<sup>(15-16)</sup>. ハイブリッド人工材料は高分子材料を足場として, 生体組織を誘導して新生させた後に脱細胞処理を施して得る材料で, 高分子材料が構造強度を維持し, 材料の最表面にある細胞外マトリクスが優れた生体適合性を示す事を期待した構成となっている.

## 2. 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, ポリエステルの片面起毛ベロア繊維を使用し, 直径 15mm 厚さ 1mm の円状に成型した. これを 4 枚 1 組として外型へ封入した. 外型は上下 2 つのパーツで構成し, 厚さ 0.6mm, 縦 35mm, 横 35mm のシート状のユニットとした. ユニット 1 枚につき 4 つのポリエステルベロア足場を内装可能な形状で作製した. 端部と中央部分に細胞・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. この埋め込みユニットをヤギの皮下へ埋込を行い広背筋上に縫合して固定した. 約 3 ヶ月 (89 日間) の埋込後にユニットを摘出した. 取り出し後に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、その後生理塩水を用いてリンスを3日間実施した。

## 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種類で実施した。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分実施し、乾熱滅菌は160℃で120分、EOG滅菌は37℃で120分、過酸化水素ガスプラズマ滅菌は45℃で45分、ガンマ線滅菌は25kGyの照射を行った。

## 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・形状・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 $\mu$ Aの条件で撮影した。

## 2-4 ハイブリッド材料上での細胞培養

滅菌後のハイブリッド材料の細胞接着性を評価するために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 $\times$ 10<sup>6</sup>個)を滴下し、24時間後に同様に滴下した。その後72時間シャーレ上で培養した。培養後、試料をリン酸緩衝ホルマリン水溶液(10%)を用いて化学固定した後に、DAPI染色を行い、蛍光顕微鏡(BZ-9000, キーエンス, 日本)で観察して、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、ユニットの取り出しを行った。すべての足場には細胞誘導孔から組織が新生され、全面がハイブリッド化が完了していた。

### 3-2 ハイブリッド材料の構造変化比較

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。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。細胞培養において、最も多くの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であった。

## 4. 考察

構造変化を観察した試験では、オートクレーブ・乾熱滅菌では網目構造の変化が生じた。この変化は熱によるタンパク変性が生じたものと考えられる。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。高い熱は生じない滅菌方法であるが、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

ハイブリッド材料を様々な条件下で複数の滅菌方法もちいて、滅菌前後の変化から最適な滅菌方法を調査した。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。ハイブリッド材料に対して構造変化と細胞接着性の低下に最も影響を与えない滅菌方法はガンマ線滅菌であった。

## 参考文献

- (1) Suh, Hwal. "Recent advances in biomaterials." *Yonsei Medical Journal* 39 (1998): 87-96.
- (2) Langer, Robert, and David A. Tirrell. "Designing materials for biology and medicine." *Nature* 428.6982 (2004): 487-492.
- (3) Peppas, Nicholas A., and Robert Langer. "New challenges in biomaterials." *Science-AAAS-Weekly Paper Edition-including Guide to Scientific Information* 263.5154 (1994): 1715-1719.
- (4) M. Geethaa, A.K. Singhb, R. Asokamania, A.K. Gogiatic. "Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants—a review." *Progress in Materials Science* 54,3, pp397-425 (2009)
- (5) Xue, Lian, and Howard P. Greisler. "Biomaterials in the development and future of vascular grafts." *Journal of vascular surgery* 37.2 (2003): 472-480.
- (6) Y Hoffman, Allan S., et al. "Application of radiation-grafted hydrogels as blood-contacting biomaterials." *Radiation Physics and Chemistry* (1977) 22.1 (1983): 267-283.
- (7) Meyer, Anna Lassia, et al. "Thrombus formation in a HeartMate II left ventricular assist device." *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 135.1 (2008): 203-204.
- (8) Schmid, Christof, et al. "Influence of inflow cannula length in axial-flow pumps on neurologic adverse event

- rate: results from a multi-center analysis." *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 27.3 (2008): 253-260.
- (9) Najjar, Samer S., et al. "An analysis of pump thrombus events in patients in the HeartWare ADVANCE bridge to transplant and continued access protocol trial." *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 33.1 (2014): 23-34.
- (10) Yamada, Yukiko, et al. "Neointima-inducing inflow cannula with titanium mesh for left ventricular assist device." *Journal of Artificial Organs* 14.4 (2011): 269-275.
- (11) Aodai, Toshiyuki, et al. "Effect of metal surface characteristics on the adhesion performance of the integrated low-level energies method of adhesion." *Journal of Artificial Organs* 15.4 (2012): 386-394.
- (12) Rose EA, Levin HR, Oz MC, Frazier OH, Macmanus QW, Burton NA, Lefrak EA. Artificial circulatory support with textured interior surface. A counterintuitive approach to minimizing thromboembolism. *Circulation*. 1994;90:II87-91.
- (13) Jamieson, W. R. E., et al. "Carpentier-Edwards standard porcine bioprosthesis: primary tissue failure (structural valve deterioration) by age groups." *The Annals of thoracic surgery* 46.2 (1988): 155-162.
- (14) Pelletier, L. Conrad, et al. "Porcine versus pericardial bioprostheses: a comparison of late results in 1,593 patients." *The Annals of thoracic surgery* 47.3 (1989): 352-361.
- (15) Kishi A, Isoyama T, Saito I, Miura H, Nakagawa H, Kouno A, Ono T, Inoue Y, Yamaguchi S, Wei S, Abe Y, Imachi K, and Noshiro M., Use of In Vivo Insert Molding to Form a Jellyfish Valve Leaflet. *Artificial Organs* 34, vol.12, pp1125-1131, 2010
- (16) Kawase, Yukino, et al. "Development of hybrid blood removal cannula use of titan rigid for ventricular assist device (VAD)." *Seitaiikougaku* 51.Supplement (2013): R-229.