

生体組織/高分子複合化による経皮デバイスの作製

Preparation of percutaneous device by incorporating polymer with decellularized tissue composite

○松嶋理恵(東医歯大生材研) 嶋津友紀子(東医歯大生材研) 南広祐(東医歯大生材研)

木村剛(東医歯大生材研) 藤里俊哉(阪工大) 岸田晶夫(東医歯大生材研)

Rie MATSUSHIMA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Yukiko SHIMATSU, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Kwangwoo NAM, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Tsuyoshi KIMURA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Toshiya FUJISATO, Faculty of Engineering, Osaka Institute of Technology

Akio KISHIDA, Institute of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University

Abstract: Percutaneous devices (PD) are indispensable in the modern medicine. The most serious problem of PD is lack of tissue-anchoring and down-growth of epithelial cells. So in this study, we examined the methods of polymerization in the decellularized dermis after impregnated the tissue with methyl methacrylate. These results suggest that the polymerization in the tissue can be found their method.

Key Words: percutaneous device, decellularized dermis, composite

1. 諸言

腹膜透析や中心静脈栄養法などにおいて生体の内外を連結する目的で用いられる経皮デバイスは広く利用されているが、経皮デバイスは一般的にシリコンゴム・ポリ塩化ビニル等が用いられているが、これらの材料は、皮膚組織との結合性が低いため、細菌感染が生じる問題がある⁽¹⁾。現状では、看護スタッフや患者自身の細心の注意のもとに使用されているが、患者の QOL 向上や新医療技術の一般化のために、高機能な経皮デバイスが求められている。

これまでに、コラーゲンによる表面修飾やハイドロキシアパタイトの応用などが試みられているが、臨床応用には至っていない^{(2),(3)}。

そこで我々は、生体組織と人工デバイスの接着性の向上を目的として、脱細胞化生体組織と人工材料を複合化した新規経皮デバイスの可能性について検討した。

本研究では、脱細胞化生体組織にモノマーを浸透させた後、マトリクス内で重合させ複合化することにより、生体組織側の界面を脱細胞化組織、人工デバイスとの界面を浸透させた高分子とすることで高い接着性を実現することを試みた。今回は、ブタ脱細胞化真皮を用いてモノマーの浸透、重合条件などについての検討を行った。

2. 実験

2-1 脱細胞化真皮組織の調製と評価

2-1-1 ブタ真皮層の採取

成体ブタ皮膚は東京芝浦臓器株式会社より入手した。表皮層から厚さ 2~5mm の腹部の皮膚を切り取り、体毛、皮下脂肪、表皮層を除去して真皮層を得た。

2-1-2 高静水圧印加処理(HHP)による真皮の脱細胞化

冷間等方印加装置を用いて、30℃にて 10,000 気圧の高静水圧印加処理を 10 分間行った後、0.2mg/ml DNase I、50mmol/l MgCl₂ 含有生理食塩水に浸漬し、37℃下で 10 日間振盪洗浄し、80%エタノール/生理食塩水において 4℃下で 3 日間脱脂処理を行い、続いてクエン酸バッファーにて、4℃下、3 日間脱灰処理を行った^{(4),(5)}。

2-1-3 組織学的評価

未処理および脱細胞化真皮を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、エタノールで段階脱水後、パラフィン包埋し、ミクロトームを用いて厚さ 4μm の薄切切片を作製した。脱パラフィン後、切片をヘマトキシリン-エオジン(HE)染色、エラスチカワンギーソン(EVG)染色し、光学顕微鏡による観察を行った。

2-2 脱細胞化真皮/高分子複合体の作製

2-2-1 モノマーの UV 重合

モノマーとしてはメタクリル酸メチル(MMA)を用いた。グローブボックス内で、MMA に対し、光重合開始剤を任意の割合で加えた。光重合開始剤については、1-ヒドロキシシクロヘキシルフェニルケトン(HK)および 2,4,6-トリメチルベンゾイルジフェニルホスフィンオキシド(TMPO)と HK の混合物の 2 種類を用いることにし、UV ランプを用いて 60 分間の UV 重合を行った。このとき、温度変化をサーモグラフィーを用いて観察した。

得られた PMMA を再沈精製し、重合率を算出した。また GPC を用いて平均分子量を算出した。

2-2-2 脱細胞化真皮/高分子複合体の作製

調製した脱細胞化真皮を凍結乾燥し、グローブボックス内で、光重合開始剤を混合した MMA に浸漬した。その後、60 分間 UV 重合を行い、複合体を得た。

2-2-3 複合体の評価

脱細胞化真皮および脱細胞化真皮/高分子複合体は液体窒素により凍結乾燥した。破断面を Au コーティングした後、走査型電子顕微鏡によって表面の観察を行った。

また、作製した複合体はクリープメータを用いて圧縮試験を行った。複合体に 0.01N の荷重を加え厚み測定を行った後、さらに 0.05mm/min の速度で 20N の荷重を加えた。

3. 結果と考察

3-1 脱細胞化真皮

未処理の真皮および HHP による脱細胞化真皮のデジタル写真および HE 染色、EVG 染色結果を Fig.1 に示す。

HHP による脱細胞化処理では、未処理のものと比較し、白色で表面がなめらかな真皮が得られた。HE 染色においては、細胞核の除去が観察され、コラーゲン線維間の間隙の増加がみられた。EVG 染色では、濃い青色に染まるエラスチンの残存が確認された。

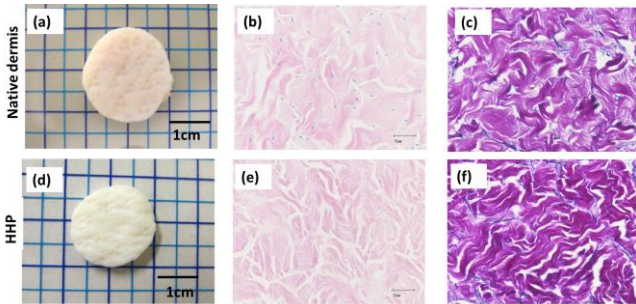


Fig.1 Photographic images and (a,b,c):native dermis, (d,e,f):dermis decellularized by HHP.

3-2 MMA の UV 重合

MMA の UV 重合時の温度変化の結果を Fig.2 に示す。重合開始剤の濃度により温度変化の挙動に違いが見られるものの約 60 分間の重合時間が必要であった。重合開始剤の種類に注目すると、MMA に対し HK を 1wt% 加えた PMMA1wt%(HK)と HK と TMPO の混合物を MMA に対し、1wt%加えた PMMA1wt%(HK:TMPO)を比較すると、PMMA1wt%(HK)では 35 分に温度のピークが見られるのに対し、PMMA1wt%(HK:TMPO)では 20 分に温度のピークが見られることが分かった。

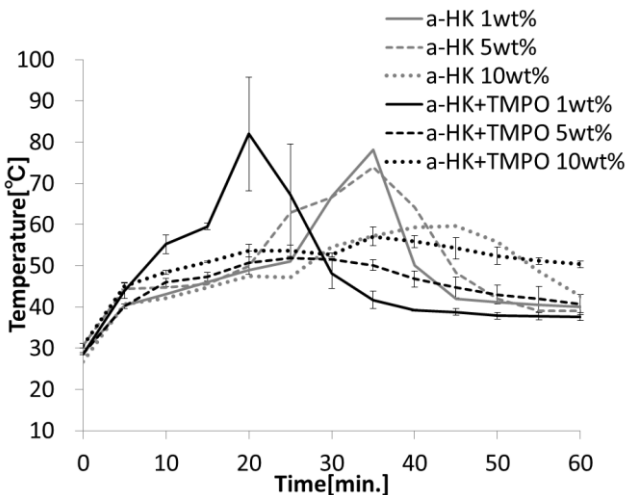


Fig.2 Temperature change during MMA polymerization using photoinitiator.

3-4 脱細胞化真皮/PMMA 複合体

凍結乾燥した脱細胞化真皮を MMA に浸漬したところ速やかな浸透が観察され、組織との重量比 100%程度に達した。この結果より、組織内への MMA の浸透は容易であることが分かった。

脱細胞化真皮および脱細胞化真皮/PMMA1wt%(HK:BAP)複合体のデジタル写真および破断面の SEM 写真を Fig.3 に示す。

脱細胞化真皮においてはコラーゲン線維が確認されたが、脱細胞化真皮/PMMA1wt%(HK:TMPO)複合体では、線維の引き抜けなどが観察されなかった。このことから作製した複合体では、組織内部において MMA の重合が進行したと考えられる。

続いて、脱細胞化真皮および複合体、PMMA の圧縮試験の結果を Fig.4 に示す。複合体の応力-歪曲線では、脱細胞化真皮と比較し、初期強度の増加が観察された。

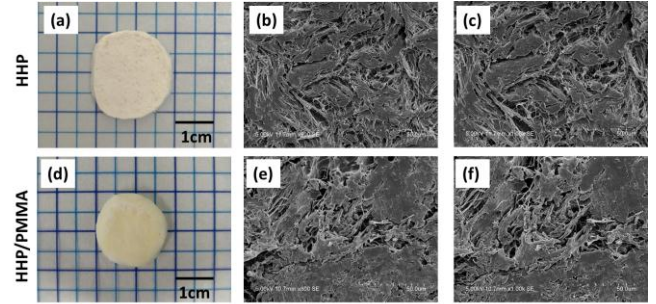


Fig.3 Photographic images and SEM images (a,b,c): dermis decellularized by HHP, (d,e,f):HHP/PMMA1wt%(HK:TMPO) composite.

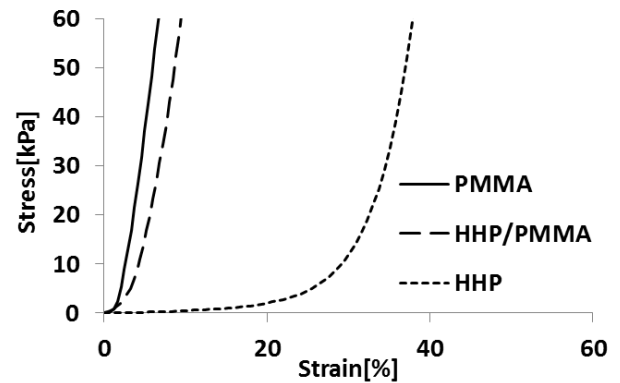


Fig.4 Stress-strain curve of decellularized dermis/PMMA composite.

4. 結論

高静水圧印加処理により脱細胞化真皮を作製した。凍結乾燥した脱細胞化真皮に MMA を浸漬させた後、UV 照射することにより、脱細胞真皮/PMMA 複合体を作製することが出来た。作製した複合体の応力-歪曲線は、未処理の脱細胞化真皮と比較し、初期強度の増加が観察された。

参考文献

- (1) Yu C, Sun Y, Bradfield J, Fiordalisi I, et al. *ASAIO J*, 1999; **45**(6): 531-4.
- (2) Furuzono T, Yasuda S, Kimura T, Tanaka J, Kishida A, *J. Artif. Organs.*, 2004; **7**(3), 137-144.
- (3) H. Aoki *et al.*, *MED. Prog. Technol.*, 1987; **12**, 213
- (4) Hashimoto H, Funamoto S, Sasaki S, et al. *Biomaterials* 2010; **31**:3941-48.
- (5) Funamoto S, Nam K, Kimura T, et al. *Biomaterials* 2010; **31**: 3590-95.