

脱細胞化真皮に対するモノマーの浸透性評価

The characteristic of monomers' permeability to the decellularized dermis

○ 張 永巍, 松島 理恵, 嶋津 友紀子, 南 広祐, 木村 剛, 岸田 晶夫(医科歯科大)

YongWei ZHANG, Rie MATUSIMA, Yukiko SHIMATSU, Kwangwoo NAM, Tsuyoshi KIMURA, Akio KISHIDA
Tokyo Medical and Dental University

Abstract: To develop a new complex biomaterial, we developed a decellularized dermis / poly(methyl methacrylate)(PMMA) complex by soaking MMA. In order to expand the application, we decided to investigate how the monomers are soaked by the decellularized dermis. For this, we decellularized the dermis using SDS which showed very good decellular efficiency. For the soaking test, we used in various monomers. We found that the monomers with carboxyl groups would be penetrate into the dermis and further into the collagen fibril layers which indicates that the molecular level anchoring would occur once this monomer is polymerized. On the other hand, the hydrophobic monomers would be soaked very high for the first 5 minutes but would not be penetrating into the collagen fibril layers. This implies that the controlling of the monomers side chain groups should be done in order to obtain a complex biomaterial with good biocompatibility and high mechanical strength.

Key Words: complex material, decellularized dermis, monomer, permeability

1. 緒言

医用複合材料は二つ以上の異なる物理的な特性や生物学的な特性を有する材料から複合された機能性生体材料である。医用複合材料には、良好な生体適応性、機械的な強度と弾性などの特性が要求されている。そのため、コラーゲン/ヒドロキシapatite、ゼラチン/ヒドロキシapatiteなどの柔-硬複合体が研究されている。^{1,2)}しかし、どれも明確な界面を有するため、外力を加えると、応力の違いにより、容易に脱落する。界面の問題は生体医用複合体にとって非常に重要である。

そこで、我々の研究グループは高い生体適応性と高い機械的物性を有する脱細胞化豚真皮を基盤とし、メタクリル酸メチルモノマー (MMA) を真皮に浸透させ、バルク重合より、傾斜方の脱細胞化豚真皮/高分子 (ポリメタクリル酸メチル:PMMA) 複合体モデルを作製した。³⁾この複合体は生体内で優れた組織融合性を有し、また上皮細胞のダウングロースを抑制することが可能であることから医用複合材料として有用であると報告した。

本研究では、様々な官能基を有するモノマーを用いて脱細胞化豚真皮にモノマーを浸透させることで、脱細胞化豚真皮との分子レベルでの複合化可能性を評価した。これは、組織内部に存在するコラーゲン繊維間隙間まで浸透し、分子レベルでの複合化が可能で探索することで、明確な界面がなく、高い生体適応性、細胞接着性と真皮に類似した力学特性を示す医用複合材料に最も重要である。モノマーの浸透性を詳しく検討し、分子レベルでの複合化に必要な条件を調べた。

2. 実験方法

2-1. 真皮の採取

成体ブタ皮膚は東京芝浦臓器株式会社より入手した。表皮および皮下脂肪をデルマトームで除去し真皮層を採取した。採取した真皮層は直径 1.5cm の円柱型に成形し、生理食塩水で洗浄した。

2-2. 脱細胞化真皮の作製

2-2-1. SDS 脱細胞法

豚真皮を 0.5% SDS 水溶液に浸漬し、室温で 72 時間振盪した。その後 DNA 残渣を除去するため、PBS で一週間洗浄した。

2-2-2. Triton x-100 脱細胞法

豚真皮を 0.25% trypsin に浸漬し、室温で 6 時間振盪した。その後、3% H₂O₂ で 15 分間処理し、1% Tritonx-100 を用い室温で 6 時間振盪した。振盪後、水 1 日、PBS 3 日間洗浄した。

2-3. 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、パラフィン包埋後、ミクロトームを用いて切片を作製した。脱パラフィン後、切片をヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を行い、光学顕微鏡により観察した。

2-4. DNA 定量

凍結乾燥した脱細胞化真皮を 50 mM Tris-HCl, 50 µg/ml Proteinase K, 1 % w/v SDS, 100 mM NaCl, 20 mM EDTA-2Na に入れ、組織を分解した。フェノール/クロロホルム法によりゲノム DNA の抽出を行い、エタノール沈殿後、紫外-可視分光光度計を用いて 260 nm の吸光度を測定し、DNA 量を算出した。

2-5. モノマー浸透性評価

モノマーの浸透性を評価するため、アクリル酸 (AA) 、メタクリル酸 n-ブチル (n-BMA)、メタクリル酸 2-ヒドロキシエチル (HEMA)、MMA を選択した。コントロールとして水の浸透性も計測した。

脱細胞化真皮を凍結乾燥した後、水、モノマーに浸漬させ、浸漬後の重量を測定し、下記の式より各モノマーに対する脱細胞化組織の膨潤率 W(%) を計算した。

$$W(\%) = (W_t - W_d) / W_d \times 100$$

W: モノマーの膨潤率

W_t: 時間点サンプルの重量

W_d: サンプルの乾燥重量

また、モノマーの比重と分子量がそれぞれ異なるため、浸透したモノマーと水の体積%とモル数を計算し、浸透挙動を検討した。

3. 結果

3-1. 脱細胞化組織評価

HE 染色から各脱細胞化皮膚組織では、細胞成分が除去

されたことを確認した。未処理と比べ、脱細胞化皮膚組織において、大きな構造の変化はなかった(Fig. 1)。

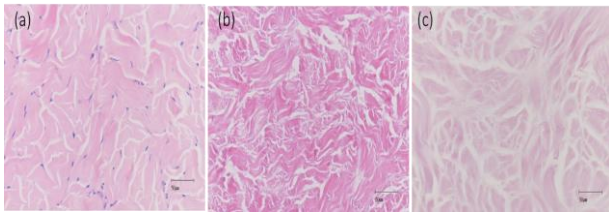


Fig. 1. HE staining images of (a) Non-treated dermis, (b) SDS-treated decellularized dermis. (c) Triton x-100-treated decellularized dermis.

DNA 定量においては、未処理皮膚組織と比較し、SDS 処理した脱細胞化皮膚組織の DNA 残量が減少した。また、SDS 処理は Triton x-100 処理した脱細胞化皮膚組織と比較しても DNA 残量が少なかった (Fig. 2)。以上のことから SDS 脱細胞化処理法は組織構造を維持する上で、DNA 残渣を除去することを確認された。

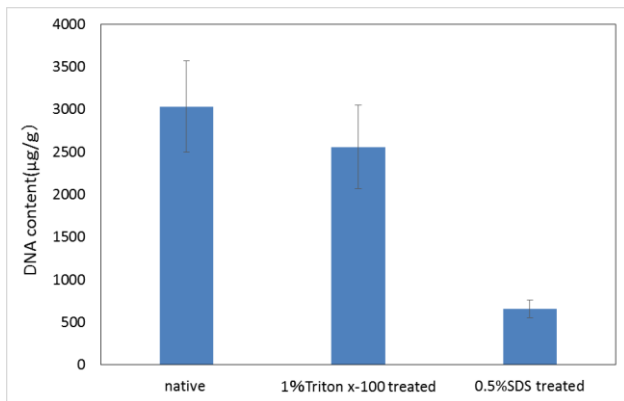


Fig. 2. Quantitative analysis of DNA in dermis

3-2. 浸透性評価

浸透性実験の結果から、脱細胞化豚真皮に対して、すべてのモノマーは浸透することをわかった。最初5分では、高い浸透性が現れたものの、親水性モノマーが疎水性モノマーより多く浸透することがわかった。AA と水は、時間をかけて徐々に脱細胞化真皮組織に浸透した。一方、AA 以外のモノマーは短時間に浸透し、その後の変化量は少なかった (Fig. 3)。

4. 考察

SDS 処理法で処理した豚真皮組織は未処理真皮組織と比べ、DNA 量の減少が発見され、組織の構造も維持できることを確認された。Tritonx-100 処理法に関しては、組織構造を維持できたが、DNA 成分の残存が高かった(Fig.1, Fig.2)。DNA 成分より起こされる拒絶反応のリスクから考え、今回 SDS 法で調製した脱細胞化豚真皮を次のモノマー浸透実験に用いた。

我々以前の実験で、組織が脱細胞化された後、元々細胞が存在した空間が残り、その空間に MMA が毛細管現象により、浸透することを観察した。³⁾ 今回の実験結果から、選んだすべてのモノマーにおいて、脱細胞化豚真皮に浸透することを確認した。HEMA、n-BMA が MMA と同様に、短時間に脱細胞化豚真皮に浸透するものの、その後の浸透は激減する。HEMA と n-BMA は脱細胞化処理より、大きな空間に浸透したと考えられる。一方、AA と水は最初の

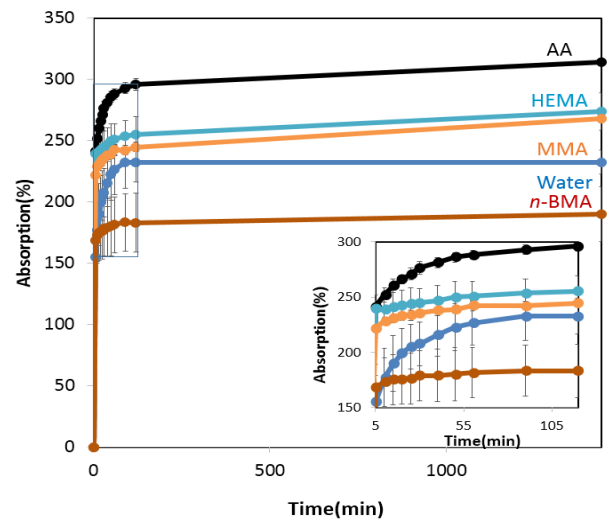


Fig. 3. The permeability of monomer to decellularized dermis.

浸透性においては HEMA、n-BMA、MMA と同様であった。しかし、その後、モノマーの吸収は続けられることを見出した。これは、2次吸収による現象であり、AA モノマーや水がコラーゲン繊維層に浸透したことを意味する。これから、AA と生体組織は分子レベルでの複合化が可能であると考えられる。

それぞれのモノマーと水は比重と分子量が異なるため、浸透量のデータを用いて脱細胞化豚真皮に浸透したモノマーの体積とモル質量に換算する必要がある。その結果、水が最高の浸透性を見せ、AA はその次であった。一方、n-BMA の場合、最低の浸透性を示した。AA はカルボキシル基を、n-BMA はメチル基を有している。浸透性がモノマーの官能基の種類に依存しているため、その官能基を変えることで浸透性を調節できると考えられる。また、分子レベルでの複合化には、モノマーの浸透性が最も重要である。水のように2次吸収が発生した場合、モノマーはコラーゲン繊維間まで浸透するため、モノマーを重合させることにより分子レベルでの複合化が可能になると考えられる。

5. 結論

モノマーの官能基により脱細胞真皮内での浸透は変化する。カルボキシル基を有する AA の場合、2次吸収が発生し、コラーゲン繊維間まで浸透する。これは、モノマーの官能基を調節することで、明確な界面がなく、高い生体適応性、細胞接着性と真皮に類似した力学特性を有する複合体の作製が可能であることを示している。

参考文献

- (1) C. Liu, Z. Han, J.T. Czernuszka, Gradient collagen/nano-hydroxyapatite composite scaffold: development and characterization, *Acta Biomater.* vol.5, pp. 661-669, 2009.
- (2) A. Aviv-Gavriel, N. Garti, H. Füredi-Milhofer, Preparation of a partially calcified gelatin membrane as a model for a soft-to-hard tissue interface, *Langmuir.* vol.29, pp. 683-689, 2013.
- (3) R. Matsushima, K. Nam, Y. Shimatsu, T. Kimura, A. Kishida, Decellularized dermis-polymer complex provides a platform for soft-to-hard tissue interfaces, *Mater Sci Eng.* vol. 35C, pp. 354-362, 2014.