B118 MPC ポリマーを用いた耐感染性人工弁の開発

Development of anti-infectious prosthetic heart valve with surface-modified by MPC polymer

○ 山田康一郎(東医歯大院), 小林史明(中央大), 岩崎泰彦(東医歯大)

石原一彦(東大), 高久田和夫(東医歯大)

Koichiro YAMADA*, Fumiaki KOBAYASHI**, Yasuhiko IWASAKI*

Kazuhiko ISHIHARA***, Kazuo TAKAKUDA*

*: Tokyo Medical and Dental University, 2-3-10, Kanda-Surugadai, Chiyoda-ku, Tokyo

*: Student, Chuo University, 5-3-10, Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo

***: Tokyo University, 7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo

Key word : Biomaterials, Biomechanics, MPC polymer, prosthetic heart valve

1. 緒言

心内膜炎の治療法として、心臓弁の人工物への置換がある。この人工弁は感染に弱く、いったん感染を生じると治療がきわめて困難となる。このことは生体内に適用する材料において一般的な現象である。このような難治性感染が生じる要因としては菌体外多糖であるバイオフィルムの形成がある。いったんバイオフィルムが形成されると抗生剤への抵抗性を示し、治療が困難となる。そこで我々は、耐感染性を持つ人工弁の開発を計画した。本研究では、リン脂質極性基を有する 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン(MPC)ポリマーを人工弁に被覆して擬似生体膜を生成させ、血液培地中における弁膜へのバイオフィルム形成阻害効果について検討を行った。

2. 実験方法

2.1 概要

実験概要について Fig. 1 に示す。

Fig. 1 outline of experiment

本実験では使用細菌・試料の表面修飾・培養方法についてそれぞれ条件を変動させて実験を行い、3点の評価方法を用いて検討を行った。

2.2 供試材料

人工弁の素材として、加工が容易であり、MPC ポリマーとの良好な相溶性、及び高い耐屈曲性を示すセグメント化ポリウレタン (SPU) Miractran E380ENAT(日本ミラクトラン)を選択し、7×7×1mm のシート形状にして用いた。

2.3 使用細菌群

人工弁心内膜炎の起炎菌は術後2ヶ月を境として大きく2つに分けられる。本研究ではそのうち全体の7割近くを占める3種類の細菌について検討を行った。

・早期発症(弁置換後2ヶ月以内)

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* (JCM No.2151)

表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* (JCM No.2414)

・晩期発症(弁置換後2ヶ月以降):

緑色レンサ球菌 *Streptococcus mutans* (JCM No.5175)

2.4 MPC ポリマーの被覆

MPC ポリマーの被覆方法として、被覆安定性の異なる2つの手法を用いた。比較対象としてSPUをエタノールで15分間超音波洗浄し、表面処理を施したものを非コーティング群とした。

MPCコーティング: 0.5wt%MPCポリマーを含むエタノール溶液を調整し、試料をこの溶液に浸漬し、乾燥させて溶媒留居した。その後蒸留水中に試料を浸漬してリン脂質極性基を活性化させた。

MS-IPN: MPC・SPU間の高分子架橋により、MPCコーティングに比べ被覆安定性を向上させた(MS-IPN, SPU modified by MPC polymer with the semi-Interpenetrating Polymer Network)。MPC(30mol%)、メタクリル酸2-エチルヘキシル(69.9mol%)、N'-Nメチレンビスアクリルアミド(0.1mol%)をエタノール中に溶解させ、カンファーキノン(1.0×10⁻²mol/l)、4-(N,N-ジメチルアミノ)ベンゾエート(1.0×

10^{-2} mol/l))を加えてモノマー溶液を作製し、遮光してアルゴンガスにて15分間脱気した。試料をモノマー溶液中に30分間浸漬し、取り出して可視光($\lambda=400-500$ nm, $\lambda_{\text{max}}=487$ nm)を照射、その後、試料をエタノール中に一晩浸漬して減圧乾燥を行った。

2.5 培養方法

培養条件は静置培養・循環培養の2点について検討を行った。使用細菌の増殖に適した培地としてトリプトソイ培地(TSB, BECKTON DICKINSON)を選択し、培地に乾燥正常ウサギ血漿(デンカ生研株)、または血漿タンパクであるウシ血漿フィブリノゲン(SIGMA ALDRICH)30g/l、ウシ血清アルブミン(Roche Applied Science)460g/lを溶解させ、培養液とした。

静置培養: TSB 溶液にウサギ血漿を入れた培養液に細菌を 3×10^{10} 個/ml となるよう調整し、試料を入れて 37°C 、24 時間インキュベータ内で培養を行った。緑色連鎖球菌の培養期間は繁殖期間を考慮して 72 時間とした。

循環培養: TSB 溶液にフィブリノゲン・アルブミンを入れた培養液に細菌を 3×10^9 個/ml となるよう調整し、試料を入れ、ポンプコントローラ Easy-Load LS (MASTERFLEX)を用いて流速 128ml/分(内圧: 100mHg、ヒト大動脈圧)で循環させ、74 時間培養を行った。

2.6 評価方法

蛍光観察: 試料をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド液による固定を行なったのち、試料表面のバイオフィーム中の多糖を FITC concanavalinA(SIGMA ALDRICH)で染色し、細菌中の核を Ethidium Blomide(SIGMA ALDRICH)で染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡 LSM5 PASCAL(Carl Zeiss)を用いて蛍光観察を行った。

面積測定: 試料をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、2.5%グルタルアルデヒド液による固定を行なったのち、バイオフィームを Fucsin S(CROMA-GESELLSCHA)で染色し、光学顕微鏡から PC に画像を取り込んだ後、画像解析ソフトウェアである HALCON(MVTec)により画像計測を行い、試料表面のバイオフィーム占有率を算出した。

生菌数測定: 試料をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄し、試料表面に着いた細菌を蒸留水 1ml 中に拡散させ、溶液のうち 50 μ l をチューブに入れ、ATP Assay キット(ENLITEN)を用い指示通り加えてルミノメータ Auto Lumat LB953(BERTHOLD)による生菌数測定を行った。

3. 実験結果、及び考察

蛍光観察: 黄色ブドウ球菌(Sa)、緑色連鎖球菌(Sm)の2つについて観察を行った。試料の表面修飾については MPC コーティング群と、非コーティング群の2点とした。Sa、Sm のいずれにおいても非コーティング群の試料表面にバイオフィームの付着が確認された。一方、MPC コーティング群には表面上に細菌が浮遊しているものの、バイオフィーム形成までは至っていないか、または付着の程度が比較的小さく、コーティングによってバイオフィーム形成が抑制されてい

るものと考えられた。実験結果について Fig. 2 に示す。

Fig. 2 fluorescence observation

Fig. 3 Area proportion

面積測定: 使用細菌は Sa、Sm、表皮ブドウ球菌(Se)とし、表面修飾は MS-IPN、MPC コーティング、非コーティング、培養条件として静地培養・循環培養について測定を行った。循環培養については Sa のみのデータしか得られていない。静地培養においては培養液がゲル状になりバイオフィームが形成されている様子が肉眼的に観察されたが、Sa、Se、Sm のいずれもバイオフィーム占有率は非常に低い。一方、循環培養においては非コーティング群のバイオフィーム占有率が非常に高く、コーティング群(MS-IPN、MPC コーティング)はバイオフィーム付着が抑制されていることがわかる。このことから、静地培養においては培養液自身がバイオフィーム形成に最適な足場となるため、試料への付着は見られないが、循環培養においては培養液が常に流動しているため試料への付着を余儀なくされているのではないかと考えられる。

4. 結言

蛍光観察・面積測定の2点において、バイオフィームの付着が抑制されている様子が確認できた。このことより MPC ポリマーのバイオフィーム形成阻害効果が示されたものと考えられる。

参考文献

- [1] Nobuyuki Morimoto et al: Physical properties and blood compatibility of surface-modified segmented polyurethane by semi-interpenetrating polymer networks with a phospholipid polymer, Journal of Biomaterials, 23(2002)4881-4887