

# 人工臓器への DLC コーティングによる生体防御性の向上 —加齢との関係に関する基礎的研究

## [1] 組織

代表者：福井 康裕

(東京電機大学理工学部)

対応者：山家 智之

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

舟久保 昭夫 (東京電機大学理工学部)

白石 泰之 (東北大学加齢医学研究所)

大越 康晴 (東京電機大学理工学部)

研究費：物件費 33 万 2 千円，旅費 6 万 8 千円

## [2] 研究経過

現在、人工臓器は、様々な治療を通じて病んだ臓器の機能の補助を担っているが、生体との調和において、依然として根本的な解決には至っていないのが現状である。特に、循環器系人工臓器の開発では、抗血栓性や生体適合性が耐用年数に大きく依存するため、最近では、組織工学や再生医療の観点から、安定した人工臓器の表面設計の実現が求められている。本共同研究では、抗血栓性や細胞親和性が見込まれる Diamond-like Carbon (DLC) 被膜と人工の細胞外マトリックス (Segmented Polyurethane 製繊維性 Scaffold) を組み合わせ、人工臓器と生体との調和を実現する表面技術の開発を目指し、細胞実験および慢性動物実験の観点から、DLC 被膜による生体防御性の向上について検討した。

以下、研究活動状況の概要を記す。本共同研究は、加齢医学研究所施設および東京電機大学施設にて、実施された。平成 22 年度 4 月より、東京電機大学施設では、Scaffold の作製および DLC 被膜に取り組み、作製した試料の物性評価および、DLC 被膜が細胞へ及ぼす影響を中心に検討した。これらの評価を基に、DLC 被膜が細胞に与える影響を明らかにした上で、平成 23 年 1 月 20 日に、in-vivo 評価に関する実験プロトコルについて、加齢医学研究所にて研究打ち合わせを行った。そして、1 月 28 日より、同研究所施設にて、DLC 被膜を施した Scaffold 試料を、山羊の下行大動脈部に留置し、27 日間の慢性動物実験を実



本共同研究では

1. 細胞の付着・運動機能の観点から DLC 被膜が細胞に与える影響について検討
2. DLC 被膜の生体防御性の検討

細胞実験および慢性動物実験の観点から、DLC 被膜による生体防御性の向上について検討する。

図 1 本研究の概要

施した。2 月 23 日に留置した試料を摘出し、生体防御性の検討を行った。以上の結果を基に、加齢との関係に関する基礎的研究の観点から、Scaffold 表面へ形成した DLC について、細胞に与える影響および生体防御性の向上について検討した。

## [3] 成果

### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、細胞の付着および運動機能の観点から、DLC 被膜が細胞に与える影響について検討した。エレクトロスピンニング法により、細胞の足場となる Segmented Polyurethane (SPU) 製繊維性 Scaffold (以下、Scaffold と記す。) を作製した。なお、繊維径は  $1.5\mu\text{m}$  とした。そして、原料ガスとして  $\text{CH}_4$  ガスを用い、高周波プラズマ Chemical Vapor Deposition (CVD) 法により Scaffold 繊維表面へ、細胞親和性 (細胞増殖効果) を有する DLC 被膜を行ない Scaffold 繊維上での細胞の様子を観察した。

DLC 被膜を施した Scaffold をシャーレ表面へ固定し、NIH3T3 細胞を  $0.05 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$  の濃度で接種し、繊維上を移動する細胞の挙動を 10 分間隔で 72 時間、タイムラプス撮影した。得られた画像から、細胞の

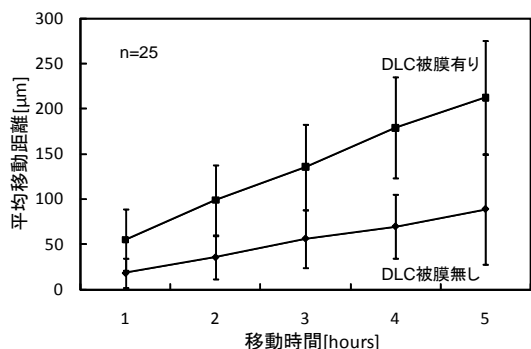


図2 Scaffold上における細胞の平均移動距離



図3 下行大動脈部での生体内留置 (in-vivo 評価)

移動距離を1時間間隔で5時間観測し、細胞の平均移動距離を算出した。

図2に Scaffold 繊維上における細胞1世代当たりの平均移動距離を示す。5時間の細胞の平均移動距離は、DLC被膜では  $212.3 \pm 62.5 [\mu\text{m}]$  であったのに対し、被膜無しでは  $88.6 \pm 60.6 [\mu\text{m}]$  であった。この時、Scaffoldの繊維から外れていた細胞も、DLC被膜によって繊維上へ誘導されて付着し、繊維に沿って細胞が移動する様子が確認された。なお、細胞の直進度は、DLC被膜有りでは  $0.97 \pm 0.25$  であったのに対し、被膜無しでは  $0.91 \pm 0.16$  であった。(この直進度は、1に近いほど細胞が直線的に移動したことを示している。) 細胞は、分裂の際に大きなエネルギーを消費するため、1世代当たりの平均移動距離が2.5倍程度に増加したDLC被膜では、細胞が繊維に沿って効率良く移動したと考えられる。これらの結果から、DLC被膜は、Scaffold繊維上へ細胞を誘導し、細胞を効率良く移動させる効果が見込まれる事が明らかになった。

第2に、DLC被膜を施した厚み  $500\mu\text{m}$  の Scaffold シートについて、in-vivo 試験による生体防御性の検討を行った。山羊の下行大動脈部に27日間(2011年1月28日~2月23日)留置し、慢性動物実験を実施した。試料摘出後、DLC被膜を施した血液接触面について、生体防御性の指標として、血栓形成の様子、内皮化の様子、および試料と生体組織の接合部の炎症反応について検討した。その結果、DLC被

膜の有無に関わらず血栓形成や、生体組織との接合部における炎症反応は見られず、良好な安定性が見込まれた。また、血液接触面には内皮化の様子が見られた。DLC被膜による内皮化の促進効果については詳細な検討が必要であるが、DLC被膜の有無に関わらず、Scaffoldによって、一定の内皮化促進効果が得られたものと見込まれる。これらの結果から、DLC被膜は、今回用いたScaffoldの既存の特性を損なうことなく、下行大動脈部での生体内留置において、良好な生体適合性が示された。

以上の評価より、本研究成果では、DLC被膜を施した Scaffold は、従来の細胞親和性に加え、細胞の誘導性および移動性を促進すると、細胞の運動機能が向上する効果が得られると同時に、in-vivo 評価では良好な生体適合性が得られた。DLC被膜と Scaffold を組み合わせることで、生体防御性の向上が見込まれる事が明らかになった。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では、上記で述べたように、DLC被膜と細胞外マトリックスを組み合わせることで、細胞の運動機能の効率を向上させると同時に、下行大動脈部での生体内留置において、良好な安定性を実現した。

人工臓器のみならず生体材料の表面処理技術として幅広く注目を集めているDLC被膜において、これまでは、細胞に及ぼす影響や下行大動脈部での生体内留置の安定性に関する知見は不十分であった。本共同研究で明らかになったDLC被膜による細胞の運動機能および生体防御性の向上に関する知見は、再生医療を含む生体医工学分において、新しい表面処理技術として発展等が期待される。これらの成果は、生体との調和を目的とした人工臓器の表面処理技術として大きな意義があると考えられる。今後は、国際会議やシンポジウム等を通じて、本共同研究による効果を基に、研究者ネットワークを拡大し、組織工学や再生医療の観点から、安定した人工臓器の表面設計の実現が期待される。また、DLC被膜そのものも、他分野への応用・萌芽的研究への研究領域が開拓され、その利用価値を著しく拡大するものと期待される。

### [4] 成果資料

1. Y. Ohgoe *et al.*, 2010 Materials Research Society Fall Meeting, Abstract QQ9.24. (2010)
2. 舟久保昭夫他；第10回日本再生医療学会総会要旨集, p.146 (2011) .
3. 福井康裕他；第10回日本再生医療学会総会要旨集, p.272 (2011) .