

血液接触デバイスとしての炭素系被膜の生体防御性と生体融合に関する研究

[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)

三浦 英和 (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3万3千円，旅費6万7千円

[2] 研究経過

ダイヤモンド状炭素 (diamond-like carbon) 膜を含む水素化アモルファス炭素 (hydrogenated amorphous carbon (a-C:H)) 膜は医療デバイスの表面処理技術としての期待が大きく、各種 a-C:H 膜において良好な生体適合性が報告されている。また、a-C:H 膜中にフッ素を含有させることで表面エネルギーを小さくし、優れた抗血栓性が得られることが報告されている一方、窒素を含有させることにより (以下、a-C:H:N と記す。)、細胞接着および増殖を促進することが知られている。人工血管素材では、安定した血液適合性を実現するために、早い段階で薄く形成された血栓の器質化によって内膜組織で被覆されることが望ましいと考えられている。本共同研究では、人工の細胞外マトリックス (Segmented Polyurethane (SPU) 製繊維性 Scaffold (以下、Scaffold と記す。)) シート表面に a-C:H:N 被膜処理を施し、細胞実験および慢性動物実験の観点から、a-C:H:N 被膜について、血液接触デバイスとしての生体防御性と生体融合について検討した。

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。東京電機大学施設では、Scaffold の作製および a-C:H:N 被膜に取り組み、作製した試料の物性評価および、a-C:H:N 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、a-C:H 膜中の窒素が細胞に与える影響を明らかにした上で、平成24年3月21日、平成25年1月15日および同年1月29日より、a-C:H:N 被膜を施した Scaffold

シートを、加齢医学研究所施設にて山羊の下行大動脈部に留置し、1ヶ月間の慢性動物実験を実施した。そして、平成24年4月25日、平成25年2月15日および同年3月5日に、留置した試料をそれぞれ抽出し、各種試料表面について、病理組織評価を行った。

[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。

第1に、*in-vitro* 試験において、細胞の付着および運動機能の観点から、a-C:H 膜中の窒素が細胞に与える影響について検討した。ガラス基板上に、繊維径 $1.5\mu\text{m}$ にて配向性を揃えた Scaffold を作製し、高周波プラズマ Chemical Vapor Deposition (CVD) 法により、この Scaffold 繊維表面へ a-C:H:N 膜を形成した。この時、 CH_4 と N_2 の混合ガスを原料として、真空容器内を $100[\text{Pa}]$ 、RF 電力 $100[\text{W}]$ 、ガス流量 $0.5[\text{sccm}]$ の条件とした。*in-vitro* 評価では、a-C:H:N 被膜を施したガラス基板の Scaffold 試料をシャーレ表面へ固定し、NIH3T3 細胞を $0.05 \times 10^4 [\text{cells}/\text{cm}^2]$ の濃度で播種し、繊維上を移動する細胞を10分間隔で72時間タイムラプス撮影し、増殖および挙動について観察した。

図1に示すように、窒素を含有しない a-C:H 被膜

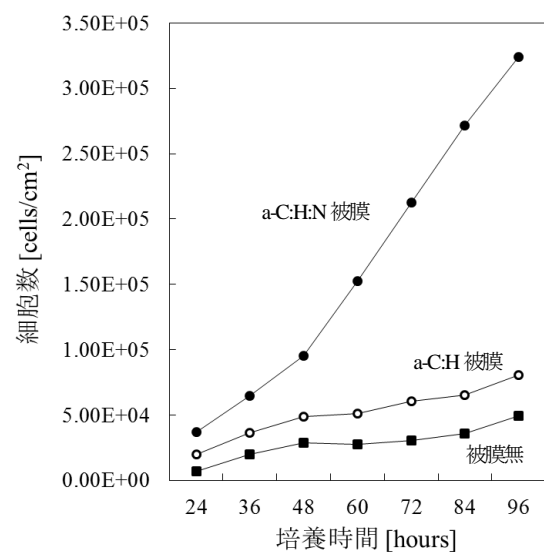


図1 Scaffold の単位面積当たりの平均細胞数

および Control である被膜無の Scaffold と比べ、a-C:H:N では、繊維上の細胞数が顕著に増加していることが確認された。これは、各試料における繊維への細胞の接着率とも相関があり、特に、被膜無の Scaffold 場合、繊維への細胞接着率が低いのにに対し、a-C:H:N 被膜では、細胞が Scaffold 繊維に誘導されて接着する様子が顕著に確認された。また、Scaffold 繊維上を移動する細胞を観察したところ、a-C:H:N 被膜では、細胞が繊維上を効率良く移動している様子が確認された。このことから、a-C:H 膜中の窒素が、細胞接着および細胞の移動性を促進しているものと考えられる。

第 2 に、a-C:H:N 被膜を施した厚み 500 μ 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 1 ヶ月間留置し、慢性動物実験を実施した。試料摘出後、a-C:H:N 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、内膜化の様子、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。

今回の実験では、窒素含有の有無に関わらず、a-C:H:N および a-C:H 被膜のいずれにおいても血栓は完全に器質化されて消失しており、これらの被膜表面（血液接触面）は、動脈硬化様に肥厚した内膜組織で完全に被覆されていた。一方、被膜無の Scaffold 表面では、一部に血栓が器質化されずに残っていた。実験動物数が少ないので普遍化するには問題があるが、a-C:H:N および a-C:H 被膜によって、血液接触面での過剰な血栓形成を抑制する傾向が見られた。（図 2、3）

また、各種血液接触面で形成された新生内膜において、増殖している細胞の免疫組織化学的形質について検討した。表面を覆っている内皮細胞は vimentin (+), smooth muscle actin (SMA) (-), desmin (-) であった。単層に配列している内皮細胞の直下には、紡錘形の内膜細胞が全体として内皮面に平行に走行しており、これらの大部分は vimentin(+), SMA(+) であり、fibroblast や myofibroblast と考えられた。相対的に少数ながら、desmin (+) の smooth muscle cell も確認された。これらの細胞の構成や分布密度には、a-C:H:N, a-C:H 被膜および被膜無の Scaffold いずれについても、同じであった。

細胞成分の浸潤については、各種 Scaffold 繊維の内部に紡錘形や星芒状の間葉系細胞が入り込んでいる様子が確認された。最も多いのは vimentin (+) の fibroblast であった。a-C:H:N 被膜では、全域全層にびまん性に入り込んでいるのに対し、a-C:H 被膜では非浸潤部もあり、細胞の浸潤が a-C:H:N 被膜と比べて不均一であった。これは、a-C:H 膜中の窒素

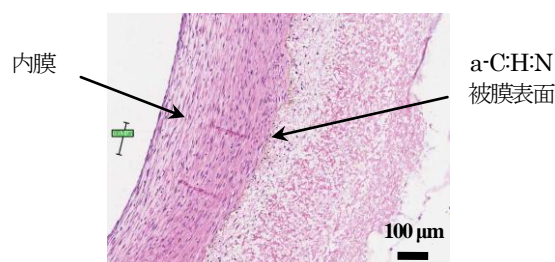


図2 a-C:H:N 被膜表面の内膜形成の様子

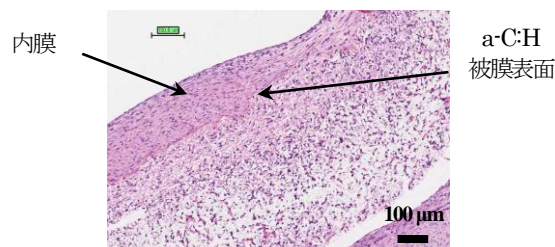


図3 a-C:H 被膜表面の内膜形成の様子

含有が、細胞成分の浸潤に影響するものと考えられる。その他、生体組織の接合部の炎症反応については、いずれの試料においても認められなかった。

以上の評価より、本研究結果では、a-C:H:N 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ともに、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。a-C:H:N 被膜と Scaffold を組み合わせることで、生体防御性および生体融合の向上が見込まれた。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では、窒素を含有した a-C:H 膜は、通常の a-C:H 膜と比較して、細胞の運動機能、増殖が促進し、良好な生体防御性や生体融合が見込まれた。これらの成果は、生体との調和を目的とした血液接触デバイス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、人工臓器等の血液接触デバイスに対し、本表面処理技術の実用化に向けた発展が期待される。

[4] 成果資料

Y. Ohgoe, T. Wada, Y. Shiraishi, H. Miura, K. K. Hirakuri, A. Funakubo, T. Yambe, and Y. Fukui, "Investigation of biocompatibility on nitrogen-doped a-C:H film coating scaffold surface in *in-vivo* and *in-vitro* tests", Mater. Res. Soc. Symp. Proc. (2012 MRS Fall Meeting) (Accepted)

現在国際誌投稿へ向け準備中である。