

## 血液適合性における内皮化を目的とした非晶質炭素膜の表面設計に関する研究

### [1] 組織

代表者：大越 康晴

(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)

吉田 謙太 (東京電機大学 理工学部)

研究費：物件費27万6千円，旅費2万4千円

### [2] 研究経過

非晶質炭素膜の1つとして知られる水素化アモルファス炭素 (hydrogenated amorphous carbon (a-C:H)) 膜は、血液適合性、細胞親和性、組織適合性等の生体融合を目的とした各種表面処理技術として期待されている。その一方で、これらの特性は、各種成膜手法を含めた成膜条件によって大きく変化するため、使用用途に適した成膜条件の設定が非常に重要である。これまで a-C:H 膜の物性は、主として膜の基本構造となる膜密度や水素含有量に加え、 $sp^2/sp^3$  構造比を中心に評価されてきたが、生体適合性という観点では、表面特性が非常に収容な要素となる。これまでの研究では、各種成膜手法によって任意に成膜された a-C:H 膜は、その成膜手法に依存することなく、a-C:H 膜表面に形成された官能基に由来する C=O 結合の比率によってゼータ電位が変化し、細胞接着性が変化することが示されている。一方、血液適合性において、デバイス表面と生体との“安定化”を得るためには、血液接触面の早期内皮化によって、血栓形成反応を抑制する表面設計が不可欠である。血液適合性材料の研究・開発は、近年ますますその重要性を増している。本共同研究では、これまでの研究成果から、図1に示すように、血液適合性における内皮化が見込まれる a-C:H 膜を対象に、その表面設計の指標について検討した。なお、本共同研究は、加齢医学研究所心臓病電子医学分野および東京電機大学にて実施し、研究の進捗状況および実験に関する打合せ等については、メール

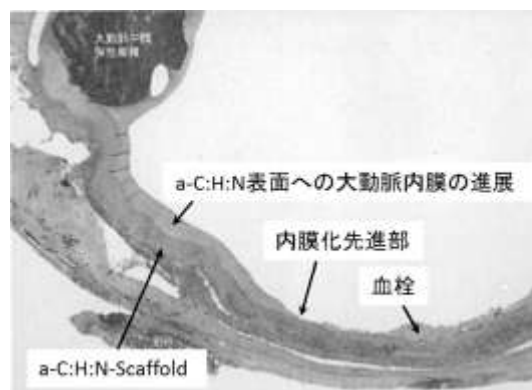


図1 a-C:H 膜表面の内皮化の様子

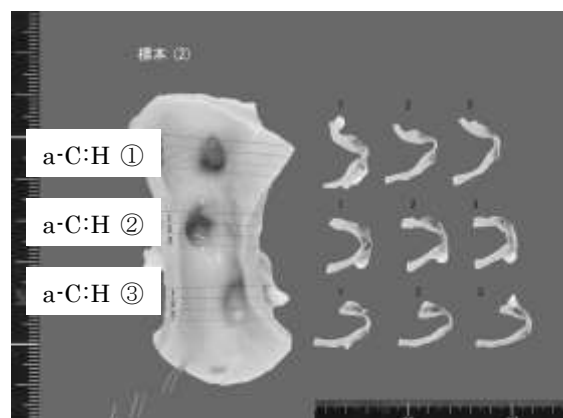


図2 a-C:H被膜Scaffoldシートを埋め込んだ山羊の下行大動脈部の摘出時の様子(図中左は、下降大動脈の内側(血液接触面)から見た様子。右は、各 a-C:H 試料について、紙面垂直方向に3つずつ切り出した断面)。

を中心に行った。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

東京電機大学施設にて、エレクトロスピンニング法により作製したセグメント化ポリウレタン製繊維性 Scaffold シート表面に、高周波プラズマ CVD 法にて、 $CH_4$  と  $N_2$  による混合ガスを原料として、a-C:H 膜を成膜した。この時、 $CH_4$  と  $N_2$  の混合比を変化させ、各種 a-C:H 膜を成膜した。加齢医学研究所心臓病電子医学分野とのこれまでの共同研究により、窒素の混合量によって、a-C:H 膜を成膜した

Scaffold 表面上での細胞の遊走性が大きく変化することが明らかにされたと同時に、山羊の下行大動脈に埋め込みを行った慢性動物実験でも、これらは良好な血液適合性を示した。そこで本共同研究では、これまでと同様に Scaffold シート (厚み: 500  $\mu\text{m}$ ) に a-C:H 膜を成膜し、図 2 に示すように、山羊の下行大動脈部に 1 ヶ月間留置したものについて病理組織評価を行い、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。以下に、本共同研究の成果を記す。

$\text{N}_2$  の混合比が高い条件で成膜した a-C:H①膜 (図 2) の全表面は、新生内膜で被われており、血栓は認められなかった。しかし、内膜は中央では一定の厚さを有し、辺縁では薄く、一部はびらん状を呈していた。また、表面に内皮細胞、直下に線維芽細胞、筋線維芽細胞、平滑筋細胞及び膠原線維を含んでいた。a-C:H 膜の下地 (基材) となる Scaffold シート内には、紡錘形や星芒状の間葉系細胞が比較的多数入り込んでいた。その一方で、 $\text{N}_2$  の混合比の低い条件で成膜した a-C:H②膜 (図 2) の全表面は、線維素性血栓で厚く被われていた。大動脈組織の辺縁から中心方向に、血栓の表層部を吸収器質化しつつ内膜化が生じていたが、中央部では血栓が露出し、内膜化が進んでいる部位でも a-C:H 膜と内膜の間には厚い血栓が介在していた。更に、 $\text{N}_2$  を混合せずに  $\text{CH}_4$  ガスのみで成膜した a-C:H 膜表面では、内膜化は全般的に進行し、比較的厚い内膜組織が形成されたが、この内膜の深部に未器質化の厚い血栓層が見られた。内膜の新生自体は良好だが、この血栓層のために、基材となる Scaffold シート内への細胞進入は進んでいなかった。また、a-C:H①および②とも、いずれも生体組織 (下降大動脈組織) との接合部に炎症反応が見られた。

これらに対し、窒素の混合比が中程度の条件で成膜した a-C:H③膜 (図 2, 3) の表面は完全な内皮化を示し、基材となる Scaffold シートへの間葉系細胞の浸潤も良好で、他の成膜条件と比較して、生体組織との接合部の炎症反応も含め、良好な血液適合性を示した。今回の実験結果では、 $\text{N}_2$  の混合比が中程度の成膜条件で成膜した a-C:H 膜が、最も良好な血液適合性を有すると見込まれる。今後は、再現性について、十分な検討が求められる。

上記に示したように、a-C:H の成膜時の  $\text{CH}_4$  と  $\text{N}_2$  の混合ガスの比率によって、a-C:H 膜表面での内膜形成過程に違いが見られた。各条件によって成膜した a-C:H 表面について、X 線光電子分光分析 (XPS) にて分析を行ったところ、a-C:H 膜表面に形成された C=O 結合の割合は、いずれも 20%程度であった。前述の通り、これまでの研究において、

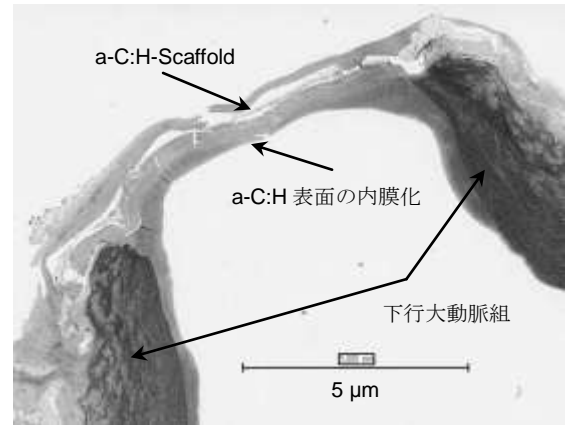


図3 窒素の混合比を中程度の条件で成膜した a-C:H 膜表面の内膜化の様子 (a-C:H③)

a-C:H 膜表面の C=O 結合の増加に伴い、細胞接着性が増すことが明らかとなっている。しかし、本研究では、a-C:H 膜表面に形成される薄い血栓層の器質化について、成膜時の  $\text{N}_2$  混合比との関連性が示唆される一方で、a-C:H 膜表面の C=O 結合の比率との関連性については不明であり、今後より詳細な検討が必要である。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究では、a-C:H 膜の内皮化促進や血液適合性について、生体防御性および生体融合性の観点から検討を行った。その結果、a-C:H 膜表面において、血栓形成→内皮の被覆→内膜細胞の浸潤増殖による内膜層の形成→基材となる Scaffold シートへの間葉系細胞の浸潤→血管壁の器質化という過程が示された。a-C:H 成膜時の窒素含有量の制御によって、a-C:H 膜表面の C=O 結合の比率が最適化されることで、a-C:H 膜による血栓の器質化や内膜化の促進が見込まれる。a-C:H 膜表面の C=O 結合と、血栓形成や血栓の器質化に伴う内皮化のプロセスとの相関性が明らかになれば、a-C:H 膜の表面設計指標が定まり、血液接触デバイスの表面処理技術として、a-C:H 膜は大いに役立つと期待される。

#### [4] 成果資料

現在国際誌投稿へ向け準備中である。