

課題番号 72

生体内環境下にて血液適合性および生体融合を促進する 表面処理の解明

[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：白石 泰之

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費9万6千円，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。また、セラミックス材料として知られるアルミナ薄膜も、関節や骨、歯といった硬組織を置換する生体材料として発展を遂げてきた。更に、セラミックスのコーティング技術も進み、スパッタリング法により形成されたアルミナ薄膜は、良好な抗血栓性が見込まれることが報告されている。抗血栓性を含む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。

これまで我々は、a-C:H被膜、或いはアルミナ被膜を繊維製の細胞足場材料 (SPU: Segmented Polyurethane Scaffold) シートに被膜し、*in-vivo* 試験において、血液適合性の観点から、生体融合性について検討を行ってきた。その結果、細胞足場材となる Scaffold シート表面では、a-C:H 被膜による細胞接着性の促進及び、アルミナ被膜による生体内不活性によって、結果として血栓形成の過剰反応が抑制され、周辺生体組織による血栓層の器質化に伴う内膜化が行われた。本研究課題では、生体内環境における血液適合性を実現する生体融合性の指標として、Scaffold シート内部への内膜細胞の浸潤または抑制の状態を明らかにし、生体融合を促進する表面処理について検討した。

以下に、研究活動状況の概要を記す。本共同研究は、加齢医学研究所および東京電機大学の施設にて実施された。生体内環境下における a-C:H 膜およびアルミナ膜の血液適合性と生体融合性に関する検討を行うに当たり、細胞足場材となる繊維状のセグメント化ポリウレタン (SPU: Segmented Polyurethane) シート (以下、Scaffold と記す。) を被膜対象とした。東京電機大学の施設では、Scaffold シートの作製、被膜の物性評価を中心に検討し、東北大学では動物実験の実施と管理、病理組織評価を担当した。なお、本研究で使用したアルミナ被膜は、株式会社アルバック製のものを使用し、a-C:H 被膜については、これまでの共同研究で得られた実験結果を基に評価し、アルミナ被膜の比較対象とした。研究を推進するに当たり、Cloud サービスを活用しながらデータを共有し、実験結果を基に、打ち合わせを実施した。特に動物実験に関しては、平成28年9月24日に実施前の打ち合わせの中で、埋め込み試験用のサンプル形状や、埋め込み部位などを決定した。そして、平成29年2月8日に、成ヤギ (日本ザーネン種、雌) を用い、慢性動物実験 (30日間) を実施した。平成29年3月10日に留置した試料を摘出した後、試料表面について、病理組織評価を行った。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、メールを中心に行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

これまでに実施した細胞接着促進型 a-C:H 被膜の評価を比較対象として、アルミナ被膜を施した Scaffold シート (厚み: 300~500 μm) について、*in-vivo* 試験による血液適合性および生体融合の検討を行った。山羊の下行大動脈部に、Scaffold シートを30日間留置し、慢性動物実験を実施した。試料摘出後、アルミナ被膜を施した血液接触面について、生体融合性の指標として、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を、病理組織評価 (染色法: HE 染色, Elastica-Masson 染色, CD31, Vimentin, SMA 免疫染色) の観点から検討した。

これまでの検討から、Scaffold シートが留置された部位では、

- ① 血栓の付着
- ② 付着した血栓表面を内皮細胞により被覆
- ③ 内皮細胞と Scaffold シート表面の間で、内膜細胞或いは筋内膜細胞と膠原線維の増殖による内膜の肥厚（内膜硬化）
- ④ 内膜と外膜側（大動脈外側）から間葉系細胞が Scaffold シート内部に進入

という① → ④ の過程が進むことが明らかになっている。また、内皮細胞および内膜細胞も、血液中から供給されるものではなく、Scaffold シートに接した大動脈組織の内皮細胞と内膜細胞が、Scaffold シートに連続的に進展することに由来するものである。a-C:H 被膜表面は、成膜条件の最適化によって、完全な内皮化を示した。基材となる Scaffold シートへの間葉系細胞の浸潤も良好で、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ている。

今回実施したアルミナ被膜でも、上述の内膜形成過程と同様に、表面に形成された内膜は、周辺組織（大動脈）に由来する内皮と内皮化組織である。アルミナ被膜表面（血液接触面）には、安定した密着性を有する内膜が良好に形成された。また、これまでと同様の実験から、本実験においても、留置中の血流によって Scaffold シート自体に生じた圧負荷に対する作用として、内膜細胞の増殖が認められると考えられる。なお、アルミナ被膜表面に形成された血栓は、既に吸収・器質化（内膜組織に置換）されており、慢性的な異物反応は認められなかった。本実験においても、Scaffold シート内部に浸潤するのは、内膜細胞（内皮化の間葉細胞＝筋内膜細胞）と考えられる。Scaffold シートへの間葉系細胞の浸潤は、主として大動脈組織（血管外表面側）から生じるものと考えられ、アルミナ被膜を施していない Scaffold シートは、アルミナ被膜有と比較して、有意に多く浸潤していることが確認された。このことから、Scaffold シートに被膜したアルミナは、内膜細胞の浸潤を阻止する働きを有することが示された。また、繊維芽細胞や筋線維芽細胞、マクロファージなど、有層性、増殖性に富む細胞が、Scaffold シート外表面下に多く存在していたことから、Scaffold 内への細胞浸潤は、大動脈外表面側からの方が明らかに優勢であることが認められた。

アルミナ被膜を施した Scaffold は、これまで評価を行ってきた a-C:H 膜と同様に、良好な生体適合性が見込まれることが示された。また、アルミナ被膜は、間葉系細胞の浸潤を阻止する特性を有することが示唆された。これは、本実験で用いたアルミナ被

表 1 生体内環境下における血液適合性および生体融合評価
(*in-vivo* 評価)

	内膜化	間葉系細胞浸潤	炎症反応
a-C:H 被膜	高	高	低
アルミナ被膜	高	低	低
被膜無し	中	高	中

膜自身が有する撥水性と表面状態が、細胞レベルにおいて浸潤に影響したものと考えられる。a-C:H 被膜とアルミナ被膜では、いずれも内膜化による良好な血液適合性を示す一方で、Scaffold への間葉系細胞の浸潤では異なる反応系を示したことから、間葉系細胞の浸潤と血液適合性および生体適合性との間に、有意な相関性は認められなかった。

（3-2）波及効果と発展性など

本共同研究では、マイクロオーダーのファイバー状の Scaffold シートを a-C:H、或いはアルミナで被覆し、新規の医用材料の創製を目的として、生体内環境における血液適合性と生体融合性について検討した。今回の評価では、生体内環境における血液適合性および生体融合性という観点では、a-C:H およびアルミナ被膜の差異は得られなかったものの、基材となる Scaffold シートへの間葉系細胞の浸潤の形態は異なり、今後、周辺組織との相互作用に応じた表面処理の選択の検討が求められる。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り、本共同研究による成果を基に、種々の表面処理技術への展開が期待される。

[4] 成果資料

1. Y. Ohgoe, H. Zama, H. Sakurai, Y. Shiraiishi, H. Miura, T. Yambe, A. Homma, "Atomic layer deposition of alumina films on segmented polyurethane microfiber scaffold sheet: *in-vivo* blood compatibility", 10th World Biomaterials Congress 2016, Abstract p. 1953, May 17-22, 2016, Montreal, Canada.
2. その他、国内外のジャーナルへの投稿の準備を進めている。