

論文の要旨

氏名 岡本圭司

論文題目 Improvement of Biocompatibility of the Diamond-like Carbon for Application to Medical Devices
(医療機器応用のためのダイヤモンドライクカーボンの生体適合性の向上に関する研究)

医療用材料の要件として材料と生体との相互作用である「界面適合性」が重要であるが、材料の「機械的適合性」も備えていなければならない。主に金属材料は前者に劣り、高分子材料は後者に劣る。また、材料の利点を組み合わせたコーティングの検討も進んでいるが、コーティング材料の機械的適合性が不十分な場合が多く、剥離などの問題が生じ、現在市販されている医療用材料にも課題が残されている。

本研究では、耐久性向上の目的で自動車部品に用いられているイオン化蒸着 (Ionized Deposition) 法による Diamond-like Carbon (DLC) コーティングを用い、医療用材料へ応用する検討を行った。機械的適合性を損なう可能性があるため、DLC のバルク組成の調整は行わず、プラズマによる表面改質を行い、表面構造のみ変更することで、界面適合性の獲得を目指すことを特徴とする。表面構造は極性基を持つ細胞膜の構造、並びにそれらを模倣したポリマーの構造に着目し、正負極性の官能基を導入し、それらの構造がもたらす物性と界面適合性の関係を明らかにすることを試みた。尚、DLC の製作にイオン化蒸着法を用いたことから、以下 ID-DLC と表記する。

プラズマ処理は高周波電源を用いた平行平板電極を持つ容量結合プラズマ方式を用いた。雰囲気ガスとして、Ar, O₂, NH₃を用い、15 秒間試料に照射した。得られた ID-DLC の表面構造は光電子分光分析法 (X-ray Photoelectron Spectroscopy: XPS) を用いて検討した。尚、C1s スペクトル解析にあたり DLC の構造を同定しなければ官能基解析も不十分となる。そこでスペクトルの非対象性を考慮した Doniach-Šunjić 関数を用い C-C *sp*³ 炭素 (283.8 eV), C-C *sp*² 炭素 (284.3 eV), H-C *sp*² 炭素 (284.8 eV), H-C *sp*³ 炭素の同定を行った上で官能基を解析した。O₂やArガスをを用いたプラズマ処理では O=C-O成分が増加した。さらにカルボキシル基の存在を確認するため化学修飾 XPS 法を用い検討を進めた。O₂プラズマ処理した試料にトリフルオロエタノールを反応させた。XPS の全炭素強度から1原子層に相当する強度とフッ素の存在比を求め、官能基の表面被覆率を検討した。O₂プラズマ処理によりカルボキシル基の表面被覆率は増加した。この結果から、O=C-OH の存在が示唆された。また NH₃ガスをを用いたプラズマ処理では N 1s スペクトルの増加が観測された。

次に、極性を持つ官能基を導入することによる表面電位の変化について、ゼータ

電位を評価した。各種プラズマ処理した ID-DLC の表面電位を評価した。プラズマ処理により、カルボキシル基を増加させるとゼータ電位が低下する傾向を示した。このことから、負極性の官能基が表面に導入されたため表面電位が低下したと考えられる。窒素の比率が増加するとゼータ電位が上昇する傾向を示した。この結果からプロトンを含む正極性のアミノ基導入が示唆された。また、未処理の ID-DLC に対し、正から負の両方向にゼータ電位を調整し得ることが明らかとなった。

こうして得た材料について、生体適合性評価を行った。最初に血液凝固特性を評価した。血液は血液中のフィブリノーゲンがトロンビンの作用により不溶性のフィブリンに変化することで凝固する。従ってトロンビンの生成を検討することで血液凝固の挙動を評価できる。トロンビンはトロンビン・アンチトロンビンⅢ複合体(TAT)を形成し、不活化されるため、TAT の濃度より血液凝固特性を検討した。実験にはヒト血液を用い、TAT の濃度上昇を分光光度計で測定した。この結果、ゼータ電位の範囲によって凝固特性が異なっており、およそ -50mV のゼータ電位を境界に電位が上昇すると血液凝固が抑えられることが明らかとなった。この理由を検討するため、凝固因子のひとつであるカリクレイン生成に及ぼす影響を TAT と同様の実験を行い、検討した。結果は TAT と同様の挙動を示した。ゼータ電位が低いとカリクレイン生成が増加し、凝固促進傾向となる理由として、プレカリクレインは陰性電荷に接触すると XⅡ 因子とともに活性化されカリクレインに変化し、凝固反応を開始することが知られている。本研究結果も同様の挙動を示していると考えられる。即ち -50mV より低いゼータ電位の場合、血液中に漂うプレカリクレインを吸着し、これを機に血液凝固が開始すると考えられる。

次に血小板粘着特性の検討を行った。血小板浮遊血漿中で試料表面に粘着した血小板の単位面積の数を走査電子顕微鏡で測定した。この結果、SUS316L に対するプラズマ処理 ID-DLC の血小板粘着数はいずれも 1/2 以下に抑制された。一方、未処理 ID-DLC は SUS316L の 3 倍の血小板粘着量であった。未処理 ID-DLC は 70° の高い接触角を示し、最も疎水性であることから、疎水性相互作用によって血小板粘着を引き起こしたと考える。尚、血小板は細胞接着分子を介して結合することから、ID-DLC の表面は血小板に関連した細胞接着分子が吸着しやすくなっていると考えられる。また、本結果より極性基を含み、 -50mV より高いゼータ電位に調整した ID-DLC は血液凝固と血小板粘着いずれも抑制することが明らかとなった。

さらに骨適合性の検討を行った。歯科や整形の治療に用いられるインプラントは速やかに周囲の骨が形成され、固定されなければならない。そこで骨形成過程への影響を検討する目的で骨芽細胞様細胞の分化の挙動を 2 種類の分化マーカーを用いて検討した。具体的には間葉系幹細胞から最終的な骨細胞形成まで関与する主要な転写因子である Runx-related transcription factor 2 (Runx2) , 及び骨芽細胞分化の初段階から形成が開始される骨基質である I 型コラーゲンについて検討した。試料は未処理の ID-DLC, O_2 プラズマ, NH_3 プラズマに加え、コントロールに純 Ti の 4 種を用いた。骨芽細胞様細胞を含む血清中にこれらの試料を置き、培養・分化を行った。培養後 Runx2 , および Col-I の mRNA 発現を Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) で解析した。未処理

ID-DLC は、コントロール Ti と比較し Runx2 ,および I 型コラーゲンのいずれも発現強度が有意に高く、即ち転写因子の生産及び、骨基質の生産が進み、骨形成が促進される可能性が示唆された。この理由について、次のように考える。まず、多血小板血漿は骨成長を促進させることが知られている。本実験の培地は血清を用いており、血小板は含まれていない。しかしながら細胞接着分子が ID-DLC 表面へ吸着しやすくなっていることが予測される。従って、血小板と骨芽細胞の両者に関与する血清中の細胞接着分子あるいはサイトカインが表面に吸着されたことで、骨芽細胞の分化を引き起こした可能性が推察される。

プラズマ表面処理技術を応用し、ID-DLC 表面へ極性の異なる官能基を導入した。さらに、これによりゼータ電位を正から負へ調整が可能となった。これらの物性と界面適合性の関係について、以下のことが明らかとなった。プラズマ処理によって-50mV より高いゼータ電位に調整することで、プレカリクレインの活性化を抑制すると考えられ、血液凝固反応を抑制した。また、プラズマ処理によって ID-DLC 表面の水接触角を低下させ、親水性に変更することで、血小板粘着を抑制させた。この表面構造は細胞接着分子との相互作用を緩和し、結果として血小板粘着を抑制したものと推察される。また、血小板粘着性を示す未処理 ID-DLC は骨芽細胞の分化を促進させた。この理由として、骨芽細胞と血小板に共通して関与する細胞接着因子あるいはサイトカインを表面に特異に吸着させている可能性が考えられる。これらメカニズムの検証と解明は今後の課題である。

また、本研究によりバルク組成を変更することなく、プラズマ処理で表面の構造を調整することで、血液適合性制御、骨芽細胞分化促進の多様な界面適合性が得られることを明らかにした。これによって、機械的適合性の維持と界面適合性の獲得の両立が実現できると考える。引き続き、治療目的や患者の状態に合わせた新規医療用材料の実現をめざし、研究を推進させる。