

生体内組織形成術を用いて作製した移植用生体組織体の脱細胞法の検討

工学部 バイオ・応用化学科 川崎あきほ（岩井研究室）、技術科学研究所 岩井良輔
北海道大学大学院 農学研究院、大分大学心臓血管外科、国立循環器病研究センター

- セールスポイント： ① 任意の立体形状を有する高強度な組織を細胞培養無で得られる
② 動物を用いて大量作製した組織をヒトに移植できる可能性がある

1. 研究目的

ウシやブタなどの家畜動物の臓器・組織の細胞を抜き取り（脱細胞）、免疫反応性を減らすことでヒトへの移植用組織として利用する脱細胞組織移植法が再生医療の一種として世界中で盛んに臨床研究されているが、動物の臓器を用いるためサイズが限定されることや、個体あたり限られた個数の臓器しか採取できないという質的・量的制限がある。我々は、生体内組織形成術として無毒で非分解性の型を患者自身の体内に埋入しておくだけで、生体の防御反応により型の周囲に形成した結合組織体を再生医療用の移植材料として開発してきた。型の形状によって様々な立体構造を持つ組織体を埋入した型の数だけ作製することができ、これまでに代用血管や心臓弁を開発してきた（Fig. 1）。本研究では、生体内組織形成術の汎用性をさらに高めるために、異種動物間（動物→ヒト）での移植を可能とするための組織の脱細胞化を検討することを目的とした。

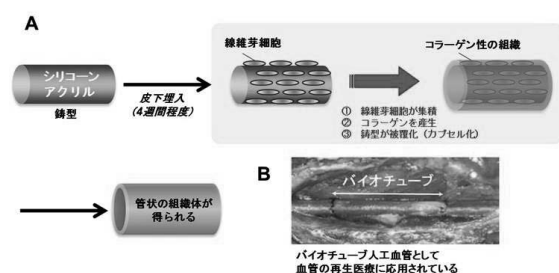


Fig. 1 生体内組織形成術による 3 次元組織の作製法 (A) と管状組織体の代用血管としての移植 (B)

2. 方法と結果

成牛の皮下に鋳型としてアクリル製の円柱材（直径 20 mm、長さ 70mm）を 2～3 ヶ月間埋入することで鋳型の周囲に形成した管状

の結合組織体を切り開き厚さ約 1 mm のシート状の組織（バイオシート）を得た（Fig. 2A）。バイオシートを TritonX-100（界面活性剤）、DNase および RNase 含む脱細胞反応液に浸漬し 37℃ で 48 時間振盪した後、薄切組織片を作製して核染色を行った。組織分析の結果、バイオシート中に核染色剤に濃染される核成分はほとんど認めず、組織の内部まで脱細胞されていることが分かった（Fig. 2B）。脱細胞処理を行ったバイオシートの破断強度を短軸引張試験により評価したところ、脱細胞処理前後で強度に変化はほとんど無く、生体の心臓弁以上の強度を有していることが分かった。

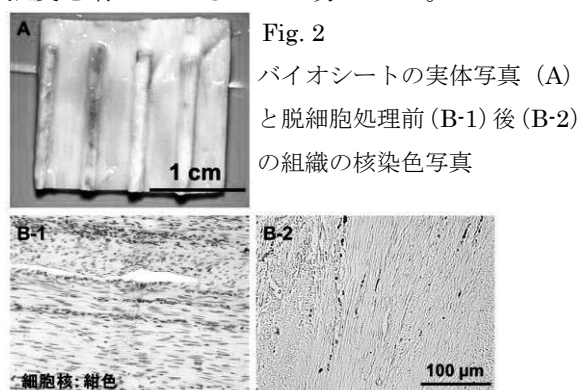


Fig. 2
バイオシートの実体写真 (A) と脱細胞処理前 (B-1) 後 (B-2) の組織の核染色写真

3. 展望と応用先

生体内組織形成術においては、鋳型を皮下に埋入するだけで任意の形状とサイズを有する高強度な組織体を細胞培養無しに得ることができる。今後、脱細胞化した組織の生体親和性が確認できれば、異種間での組織移植が可能となり、患者自身の皮下に鋳型を埋め込む必要のない、Shelf-readyでの移植が可能となると期待される。代用血管・心臓弁としての臨床応用を目指し、医療機関との共同研究を進めている。

細胞の自己集合化誘導剤を用いた細胞凝集塊の大量作製法の開発と評価

工学部 バイオ・応用化学科 浅見優月（岩井研究室）、技術科学研究所 岩井良輔
日産化学工業(株)

- セールスポイント： ① 1皿に1回の細胞播種操作で任意の数の細胞組織体を得られる
② 均一かつ任意のサイズの細胞組織体が一晩足らずの培養で得られる

1. 研究目的

再生医療の実用化や創薬試験のさらなる高効率化を達成するためには、細胞の3次元組織体を均一かつ大量に、簡便かつ迅速に作製できる組織作製技術の開発が必須であるが、従来の細胞非接着性の培養ウェルを用いた細胞組織体の作製法では、浮遊細胞のランダムな自己集合化現象を利用するため均一なサイズの細胞組織体を再現性良く得ることは困難である。また、1ウェルに1個の細胞組織体しか形成しないため、大量作製には不向きである。我々の研究グループでは、接着細胞の自発的な集合化（自己集合化）を誘導する表面コーティング剤（CAT）を開発した。CATをコーティングした培養皿に播種した細胞はCATのコーティング表面にのみ接着して隙間のない細胞の単層を形成した後、一晩足らずの培養の間に自己集合し3次元組織体を形成する。本研究では、CATをナノリットルオーダーで印刷可能な液滴スポットターを用いることで、均一かつ任意のサイズの細胞組織体を1回の細胞播種操作にて大量に作製することを目的とした。

2. 方法と結果

ナノリットル液滴スポットターを用いて細胞非接着性培養皿の表面にCAT液をドット状に印刷し（液量：500 nL, スポット数：78）乾燥させた後、間葉系幹細胞（MSC）を播種した。播種1時間以内に細胞はCATのドット印刷表面にのみ接着してコンフルエント単層を形成した後、約6～8時間後に一体集合・組織化することで3次元の細胞小球（スフェロイド）が形成した。スフェロイドのサイズは平均直径 $195 \pm 14 \mu\text{m}$ で、それらのサイズ誤差は10%以内と極めて均一であった。一方で、70～1000 nLの異なる液量のCAT液をドット状に印刷してMSCを播種すると、上記と同様に細胞は一体集合・組織化して、約150～500 μm のサイズのスフェロイドを液滴量（印刷面積）に応じて作り分けることができた（Fig. 1）。

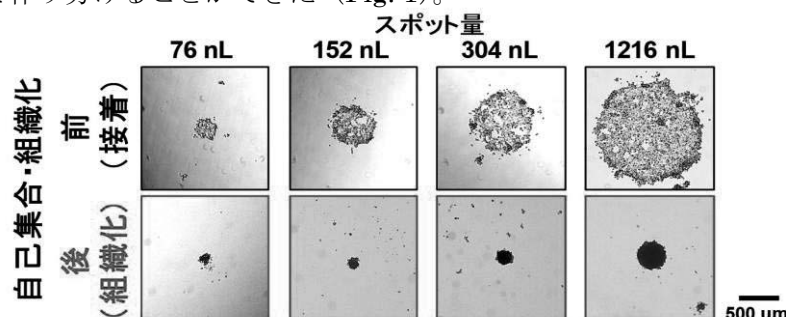


Fig. 1 CAT液のスポット量（印刷面積）に応じた任意のサイズの細胞スフェロイド

3. 結論と応用先

CATを用いた3次元組織体の作製において、任意のサイズの均一な細胞組織体を1日足らずの培養で大量に得ることが可能となった。簡便性にも優れた本組織作製法にて得られた組織体は、それ自体が移植片として、またより複雑な臓器構築のためのbuilding blockとしても再生医療や医薬品開発に対して高い利用可能性を有していると考えている。

温度制御による細胞脱着を可能とする細胞培養マイクロキャリアの開発

工学部 生命医療工学科 大梅有香, 小松大貴 (岩井研究室)、技術科学研究所 岩井良輔
北海道大学大学院 工学研究院

- セールスポイント: ① 高い細胞接着効率が得られる
② 培養温度を変えるだけで細胞を脱着できる

1. 研究目的

マイクロキャリア (MC) と呼ばれる直径数百マイクロメートルの微粒子は従来の平面培養皿よりも比表面積が100倍以上大きく、少ない培養容積で高効率に動物細胞を培養できることから、再生医療に用いる幹細胞の大量培養への応用が高く期待されている。しかしながら、MC表面への細胞接着効率が低いことや、消化酵素を用いたMCからの細胞の剥離効率 (細胞回収効率) が悪いなどの課題があった。本研究では、我々が独自に開発した両イオン性 (細胞接着促進) と温度応答性 (親水性 (細胞剥離) < 30℃ < 疎水性 (細胞接着)) の性質を併せ持つ表面コーティング剤 (CAT) をMCにコーティングすることで、高い細胞接着性と温度制御による高効率な細胞脱着が可能な細胞培養用MCを開発することを目的とした。

2. 方法と結果

赤色蛍光色素で標識した CAT の水溶液 (10~200 ng/mL) で懸濁したポリスチレン製の MC 粒子 (直径約 200 μm) を単に凍結乾燥することで、MC 全体に均一な赤色蛍光を認める CAT が表面コーティングされた MC (CAT-MC) が得られた (Fig. 1)。これらの CAT-MC を 96 穴プレート (培養ウェル) に添加した後、緑色蛍光タンパク (GFP) 組み換えラットの間葉系幹細胞を播種すると、10 分以内には CAT-MC 表面に GFP 陽性の緑色蛍光を発する生細胞の接着が認められた。培養ウェルの底面には GFP 陽性細胞が認められなかったことから、ほぼ全ての細胞が CAT-MC の表面に接着したと考えられた。培養により GFP 陽性の細胞は良好に増殖し、CAT-MC 表面の全体を完全に被覆した (Fig. 2)。また、培養温度を 37℃ から 20℃ に下げることによって細胞は CAT-MC から自動的に剥離し培養ウェル内に浮遊し回収することが可能であった。

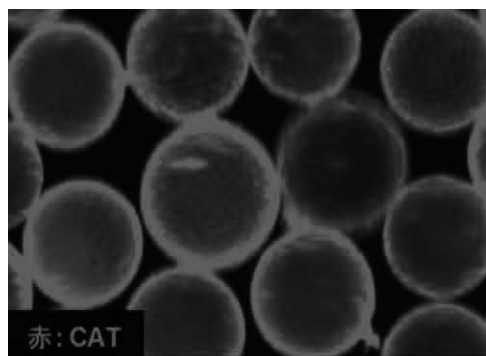


Fig. 1 CAT でコーティングした MC

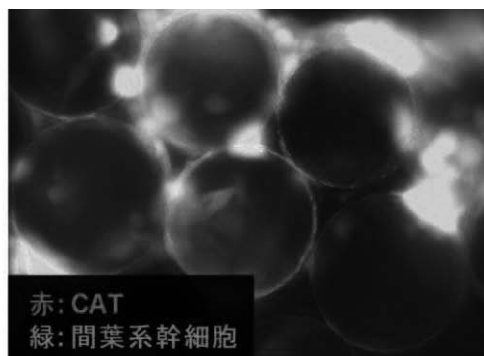


Fig. 2 CAT-MC 表面に接着し増殖した細胞

3. 結論と応用先

我々が独自に開発した表面コーティング剤である CAT を MC にコーティングすることで、MC 表面へのほぼ 100% の高い細胞接着率を達成するとともに、単に培養温度を下げるだけで細胞を剥離・回収することもできた。再生医療用のヒト幹細胞や医薬品生産のための遺伝子組み換え動物細胞の大量培養のための有用な培養担体となり得ると期待される。

細胞の自己集合化技術の癌転移評価培養系への応用検討

工学研究科 生体医工学専攻 長島 諒（岩井研究室）、技術科学研究所 岩井良輔

- セールスポイント： ① 異種細胞が混在した生体の癌組織に近似した細胞組織体 that 得られる
② 癌に特有の転移や血管新生を培養で評価できる可能性がある

1. 研究目的

培養細胞を用いた抗癌剤スクリーニング試験系として従来は平面培養皿に接着培養した単一の癌細胞が使用されてきたが、癌の転移や血管新生誘導能を正確に評価するためには、3次元構造を有し、複数種の細胞からなる生体の癌病巣に近似した組織体を作製する必要がある。我々は、接着細胞の自己集合化を誘導する表面修飾剤（CAT）を開発した。CAT をコーティングした培養表面に播種した細胞は沈降と同時に接着して伸展を開始するが、一晩足らずの培養で培養表面から剥離・集合化し単一の細胞塊が浮遊する（Fig. 1）。本研究では、CAT を用いた 3 次元細胞組織体の作製技術を癌細胞に応用することで、癌の転移や血管新生の誘導能の評価を可能とし得る、複数種の癌病巣構成細胞からなる癌近似組織体を作製することを目的とした。

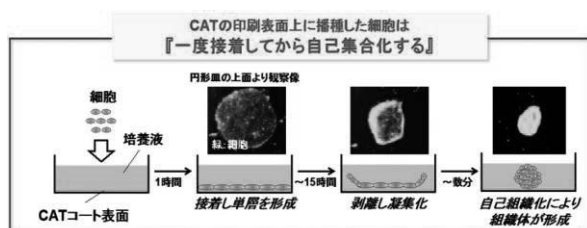


Fig. 1 CAT を用いた細胞の自己集合化による 3 次元組織体の形成

2. 方法と結果

細胞非接着性の培養皿表面に CAT 液をドット状に印刷し（液量: 1 μ L）乾燥させた後、混合比の異なるヒト肝癌細胞株（HepG2）と間葉系幹細胞（MSC）の混合液を播種した。2種の細胞の混合比に関わらず播種 1 時間以内にいずれの細胞も CAT のドット表面にのみ接

着してコンフルエント単層を形成した後、約 24 時間後に一体凝集化して HepG2 と MSC からなる 3 次元細胞組織体が形成した（Fig. 2）。組織分析の結果、細胞組織体の HepG2 と MSC の構成比は播種時の任意の混合比とほぼ同じであることが分かった。

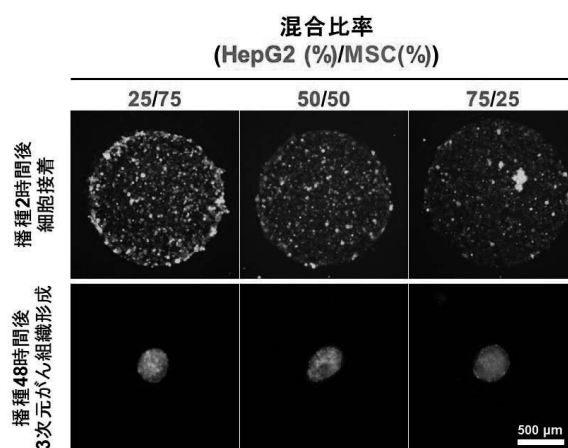


Fig. 2 HepG2（赤）とMSC（緑）からなる異種細胞混合の生体癌近似組織体

3. 結論と応用先

CATを用いた接着細胞の自己集合化技術を利用することで、異なる細胞種を混合して播種するだけで癌病巣を構成する細胞が任意の割合で混在した癌近似組織体を作製できた。近年、癌病巣に含まれるMSCや癌付随線維芽細胞が癌細胞の増殖、転移や血管誘導を促進することも明らかとなっており、このような癌細胞に付随する細胞を含む癌病巣モデルは抗癌剤のスクリーニング試験の高効率化だけでなく、抗癌剤の開発にも活用できると考えている。

HiPIMS 法を用いた医療用 DLC コーティング技術の開発

工学部 電気電子システム学科 福江紘幸（中谷研究室），技術科学研究所 中谷達行
東京電子(株) 岡野忠之，黒岩雅英

- セールスポイント： ① インプラント表面の生体適合化が可能になる
② イオン化率が向上することで高硬度化が可能となる

1. 研究目的

高齢化社会を迎えた現代において、欠損歯を補填する手段としてインプラントがある。しかし、オッセオインテグレーションの喪失などの問題がある。そこで、冠動脈用ステントへの適応実績があり、生体適合性の高いダイヤモンドライクカーボン (DLC) コーティングが注目されている。我々はインプラント用のコーティング法として、高硬度かつドロップレット低減の薄膜が成膜できるとされる大電力インパルスマグネトロンスパッタリング (HiPIMS) 法を用いたDLC成膜技術の開発に取り組んでいる。

固体原料であるターゲットの物理的特性は成膜時に様々な影響を及ぼすため、HiPIMS法でのピーク電力密度の向上のためには使用するターゲット特性の検討が重要となる。本研究では、グラファイトターゲット3種類のHiPIMS放電特性を測定し、ターゲット特性が放電特性に及ぼす影響について報告する。

2. 実験方法

Table 1に3インチのグラファイトターゲットの物理的特性を示す。基板とカソード間距離は100 mmとした。到達真空度は 5.0×10^{-4} Pa以下になるまで真空引きした。放電条件は、スパッタガスとしてアルゴンを5 sccm導入し、圧力0.5 Pa、パルス幅50 μ s、周波数200 Hz (duty比1%)、負印加電圧を800~900 Vとした。電流-電圧波形の計測には、デジタルオシロスコープ及び電流プローブ、電圧プローブを用いた。

3. 結果および考察

Fig.1 に異なるターゲット特性の印加電圧-ピーク放電電流特性を示す。Fig.1 の HiPIMS 領域において、密度が等しい Target 1 と Target 2 のピーク放電電流を比較すると、電気抵抗率

の低い Target 2 のピーク放電電流が大きい。さらに、密度の高い Target 3 のピーク放電電流は最も大きい。また、印加電圧が 900 V 一定のとき Target 1 ; 1618 W/cm²、Target 2 ; 1658 W/cm²、Target 3 ; 1797 W/cm²であった。以上より、電気抵抗率が低いほど、密度が高いほど、ピーク放電電流およびピーク電力密度が大きくなることがわかった。電流の増加は DLC 膜の高硬度化が報告されており、HiPIMS 法を用いた DLC 成膜においても高密度、低抵抗率のターゲットの使用により、生体適合性が高く、インプラントに最適であり、より高硬度な DLC 膜の可能性が示唆される。

4. 応用先

インプラントへの応用以外にもDLC膜の高硬度、低摩擦の特性から自動車産業などから注目されている。また、HiPIMS法は薄膜形成に必要な金属イオンを効率的に利用できる点から半導体製造工程における金属形成や表面の硬質薄膜など幅広い分野での応用が期待できる。

Table 1. グラファイトターゲットの物理的特性

	Target 1	Target 2	Target 3
Target bulk density [g/cm ³]	1.82	1.82	1.90
Electrical resistivity [$\mu\Omega$ m]	13	9.2	9.5

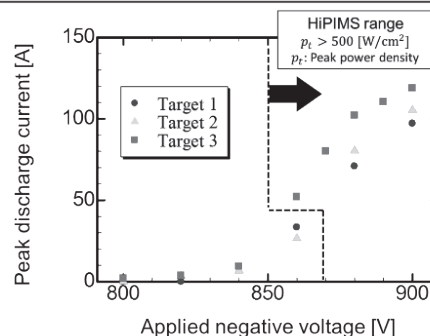


Fig. 1. 印加電圧-ピーク放電電流特性

複合ワイドレンジ真空計の開発

東京電子(株) 黒岩雅英, VISTA(株) 大迫信治, 技術科学研究所 中谷達行

- セールスポイント: ① 大気圧から 10^{-7} までの広帯域が 1 台で計測可能
 ② 常に正確なゼロ点補正が行われている
 ③ フィラメントを持たず、堅牢な真空計

1. CC-10 の概要

CC-10 は、大気圧側 ($10^5 \sim 10^{-1}$ [Pa]) をクリスタルゲージ (XTG), 真空側 ($10^0 \sim 10^{-7}$ [Pa]) をコールドカソードゲージ (CCG) で計測する複合型の真空計である。

XTG と CCG は数 Pa から数 10 Pa の範囲で計測領域が重なるのでこの圧力で切替えを行っている。両真空計のオーバーラップ領域では両者の計測値を圧力に応じた加重平均を行って圧力を表示している。



Fig.1 CC-10 外観

2. コールドカソードゲージ (CCG)

高真空領域において CCG の放電電流は対数スケール上で圧力に対して直線的に増加するので放電電流を用いて圧力を求められる。しかし Fig.2 に示すように 10^{-2} Pa 以上では放電電流の値は次第に直線から離れ 0.1 Pa 以上では飽和する。これに対し陽極電圧は、低真空においては圧力の上昇とともに低下し 0.1 Pa 以上でも変化が比較的大きい。これらのことから、低真空においては両者の計測値を用いて段階的に電流から電圧に計測を引継ぎながら圧力を求めている。

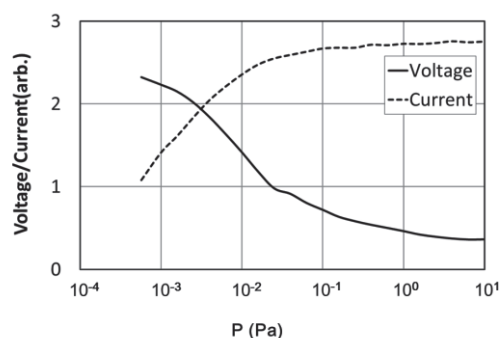


Fig.2 放電電流と圧力値

3. クリスタルゲージ (XTG)

水晶振動子を圧力センサーとして用いた XTG は、センサーに用いる水晶振動子表面と気体分子の摩擦抵抗により水晶振動子の共振インピーダンス Z が圧力に依存して変化することを利用して圧力を計測する真空計である。

CC-10 ではゼロ点の経年変化や温度による変動の影響を最小限にするために以下のような工夫を行っている。

4. 高真空排気時のゼロ点キャンセル

XTG におけるゼロ点とは、水晶振動子自身に残留する固有インピーダンス (Z_0 と表記) によるものである。Fig.3 に示すように Z_0 の値は遥かに大きい。実際の圧力計測においてはこの固有インピーダンス Z_0 を CC-10 制御部のメモリに記憶し、 $Z - Z_0$ をもとに圧力を計算している。CC-10 は複合真空計であり、CCG で高真空の検出が可能である。そこで気体分子の摩擦抵抗によるインピーダンスが無視できる高真空への到達を検出した時点で XTG の計測値 (固有インピーダンス Z_0 に相当する圧力) を新しいゼロ点としてメモリを更新するプログラムが組み込まれている。この方法により高真空に排気される度に Z_0 に相当するゼロ点の更新が行われ常に正確なゼロ点補正が可能となる。

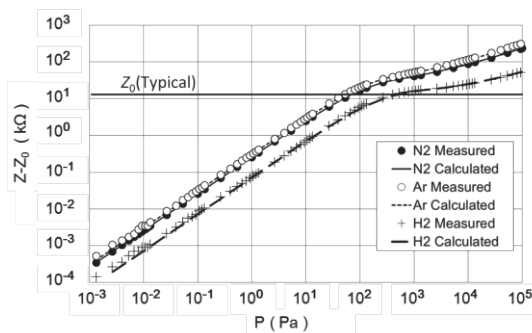


Fig.3 ゼロ点キャンセル

連絡先 TEL: 03-3969-4156, FAX: 03-3969-4158, E-mail: kuroiwa@toel.co.jp

義歯への DLC 薄膜の応用

ストローブ(株) 今井裕一, 株式会社ニッシン 加藤葉子, 堀川鉄平
兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所 神田一浩
岡山理科大学 技術科学研究所 中谷達行

- セールスポイント: ① PMMA 樹脂を変形させない常温 DLC であって口腔内で確認
② NEXAFS で類を見ない sp^3 リッチを確認
③ 口腔内で 10 か月以上の成膜効果を確認

1. 研究目的

歯科医療において、高齢化とともに、義歯の使用が増加傾向にある。義歯は PMMA (Polymethyl methacrylate) などの樹脂でできており、多孔質であるため口腔内でプラークや歯石が付着し、臭いを発する課題がある。ストローブでは、義歯成膜用のインバータープラズマ電源方式による低真空でコンパクトな CVD (Chemical Vapor Deposition 化学気相蒸着) 装置を開発し、DLC (Diamond-like Carbon) 膜の成膜に成功している。本研究では、義歯の表面及び背面に DLC 膜を成膜し、義歯床への密着具合、平坦性、人の口腔内でプラークや歯石などの汚れの付き具合や臭いの有無の評価を行ったので報告する。

2. 実験方法

成膜はインバータープラズマ電源 CVD 法を用いた。コンパクトな装置であって、義歯成膜真空チャンバーの寸法は $\phi 150 \times 80$ mm (H)、原料ガスには CH_4 ガスを使用し、合成圧力 5 Pa、印加電圧 1000 V とした。試料には PMMA 基材と義歯を用い、基材の平坦性、膜質及び DLC 成膜直後の義歯床との密着度、口腔内装着後 1 か月後、6 か月後、10 ヶ月後の防汚効果を評価した。

3. 結果および考察

義歯と同一条件で成膜した PMMA 基材の平坦性評価は、KEYENCE 社製形状解析レーザ顕微鏡 VK-X250 (Z 分解能 0.5 nm) と AFM を用いて行い、AFM による表面粗さ (R_a) の平均はブランクで 6.181 nm, DLC 成膜したもので 2.467 nm と有意な個体差を確認した。全電子収量法を用いて NEXAFS (Near-Edge X-ray Absorption

Fine Structure) を測定し $sp^2/(sp^2+sp^3)$ 比はおよそ 7.8% であり、類を見ない sp^3 -リッチと結論され、有機ポリマーに近いしなやかな膜と推定された。

Fig. 1 に、DLC 成膜直後の義歯と義歯床との密着度を示す。樹脂基材の変形が起きていないことから、常温で成膜できているものと考えられる。

Fig. 2 に、口腔内装着 10 か月経過後の義歯を示す。義歯の目視による艶は新義歯とほぼ変わりなく、プラークと歯石の付着がわずかに見られ、臭いを放っていたものの、義歯ブラシを用いて汚れを簡単に除去でき、洗浄剤を用いて臭いの除去も確認できた。

DLC 成膜義歯が、今後の歯科衛生に一つの術式として標準化されるものと期待できる。

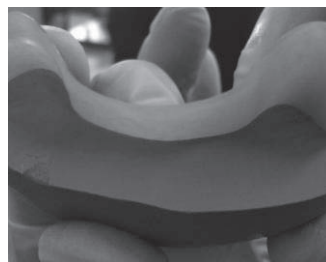


Fig. 1 DLC - PMMA 製義歯の義歯床との密着度評価

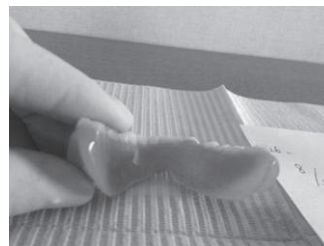


Fig. 2 口腔内装着 10 か月経過後の DLC 成膜義歯

医療用摺動部材向け DLC 薄膜の摩擦摩耗特性

工学部 機械システム工学科 ムハンマド アミヌル ヘルミ (清水・中谷研究室)

技術科学研究所 中谷達行, 工学部 機械システム工学科 清水一郎

岡山県工業技術センター 國次真輔, (株)ティーアールエス 平井広治, 橋本輝夫

- セールスポイント: ① インプラント表面の摩擦低減が可能になる
 ② 摺動部の摩擦を低減できる

1. 研究目的

DLC (Diamond-like Carbon) 膜とは, グラファイトの sp^2 結合とダイヤモンドの sp^3 結合を併せ持つアモルファス炭素膜である. DLC膜には, a-C (Amorphous Carbon) の他, 高硬度かつ高耐久性を備えた ta-C (Tetrahedral Amorphous Carbon), 生体親和性に優れた a-C:H (水素化 a-C) などがある. 我々はこれまで, 耐久性と生体親和性の両特性を兼ね備える ta-C:H (水素化 ta-C) 膜の開発に取り組んできた. 本研究は, 医療用ガイドワイヤおよび人工関節の機械的性質を改善させるために, これまでに報告した超低摩擦現象 ($\mu < 0.03$) の原因を解明することを目的とする.

2. 実験方法

基材には, SUS304 ディスク (18 mm × 18 mm × 5 mm) および SUS304 シリンダー (ϕ 15 mm × 6 mm) を用いた. a-C, ta-C, ta-C:H の成膜には陰極真空アーク法を用い, a-C:H の成膜にはイオン化蒸着法を用いた. トライボロジー特性の評価は, 振動摩擦摩耗試験 (以下 SRV 試験) 機を用いて線接触測定により行った. 試験条件は, 温度 50°C, ストローク 1 mm, 振動周波数 10 Hz, 設定荷重 10 N とし, 摩擦係数を 1 時間計測した. SRV 試験は, 異なる N_2/O_2 混合ガス比の雰囲気中で行った. Table 1 に試験中の窒素酸素ガス流量比を示す.

3. 結果および考察

Fig.1 に異なる窒素酸素ガス比による ta-C:H 膜同士の摩擦係数を示す. 摩擦係数は試験開始後, 上昇して $t=500[s]$ あたりから下降している. 摺動時間が $t=800[s]$ あたりには摩擦係数が安

定し, N_2/O_2 混合ガス比の増加に伴って摩擦係数も徐々に減少している. フェーズごとに N_2/O_2 混合ガス比を変える前の 10 秒期間での摩擦係数の平均値を計算した結果 $\mu_1=0.133$, $\mu_2=0.119$, $\mu_3=0.114$, $\mu_4=0.096$ と $\mu_5=0.057$ を得た. 窒素ガスの存在は摺動中に「Nitrogen lubrication」として影響を与える一方, 酸素ガスの存在は摩擦化学反応剤または潤滑剤として影響を及ぼすことが報告されている. 本研究においても ta-C:H の場合, 窒素ガスおよび酸素ガスの存在は摩擦係数に影響を及ぼしていることがわかった. 以上より, 超低摩擦現象の原因解明に向けた指標を得ることができた.

4. 応用先

DLC 膜は生体親和性があり無潤滑剤でも低摩擦となることからインプラントやガイドワイヤ以外への応用も期待される.

Table 1. SRV 試験中の窒素酸素ガス流量

Time [min]	Gas flow rate [L/min]	
	Nitrogen	Oxygen
0-20	0	10
20-25	2.5	7.5
25-30	5	5
30-35	7.5	2.5
35-60	10	0

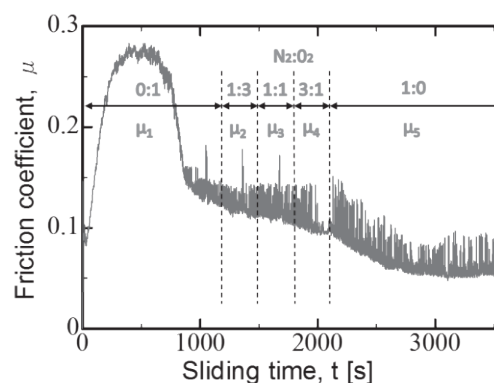


Fig. 1. 経時変化による ta-C:H 膜同士の摩擦係数

マグネシウム合金製ステントの DLC 被膜による分解速度制御

工学部 機械システム工学科 原 聡史 (清水・中谷研究室), 技術科学研究所 中谷達行
工学部 機械システム工学科 清水一郎, (株)日本医療機器技研 和田 晃, 延藤裕之

- セールスポイント: ① 生体親和性が向上できる
② 分解速度の制御が可能になる

1. 研究目的

高齢化の進む日本の死因の割合は、心疾患や脳血管疾患などが上位を占めている。この治療法にステントが使われている。しかし、既存のステントは、異物として生体内に残存し続けることで、再狭窄を引き起こすことが問題となっている。そこで生体吸収性マグネシウム (Mg) 合金をステントに適用することによって、再狭窄のリスクを低減させることができる。しかし溶出速度が速く、長期の強度保持が困難である。解決策として優れた生体親和性を持つ DLC (Diamond-Like-Carbon) を成膜させることによって、分解速度を制御できることが期待される。よって本研究は、DLC コーティングによる Mg 合金ステントの分解速度制御の可能性について、サイクリックボルタンメトリー (CV) 法を用いて電気化学測定を行って、腐食挙動を評価し、検証することを目的とする。

2. 実験方法

DLC 成膜には、平行平板型の 13.56MHz 高周波プラズマ CVD (Chemical Vapor Deposition) 装置を用いた。成膜条件は、真空到達度 7.0×10^{-3} Pa 以下、メタン (CH_4) のプロセス圧力 5Pa、ガス流量 10sccm とし、成膜時の出力は 70W で行った。試料には AZ31Mg 合金ディスク ($\phi 10\text{mm} \times 1\text{mm}$) を使い、未処理、DLC 成膜を施した 2 種類を準備した。分解速度制御の検証には、ポテンシostat を使い、電気化学測定を行った。CV 法の掃引速度は 5mV/sec とした。試験溶液には 0.9%NaCl 溶液 (310K) を用いた。基準電極には銀/塩化銀電極、補助電極には白金を用いた。

3. 結果および考察

Fig.1 に未処理と DLC 成膜をした試料のサイ

クリックボルタモグラムを示す。DLC は未処理に比べて、カソード電流が低下する。このことは還元反応の抑制を示唆している。また未処理は、自然電位 (約 -1.55 V) から -1.1V まで貴方向へ正掃引したときのアノード電流は -1.1 V で折り返す際には減少している。このことは未処理の試料が不動態化していることを示しているが、DLC の試料は正逆掃引で電流に差はなく、酸化反応が抑制されていることがわかる。Fig.2 に、腐食後の試料表面の様子を示す。未処理の試料は局部腐食が進行しているが、DLC の試料は表面全体に均一な腐食が確認される。これらの結果から、DLC コーティングを施すことにより、Mg 合金ステントの表面全体を均一に分解速度制御できる可能性が示唆される。

4. 応用先

医療デバイス以外にも、DLC 成膜により耐食性が向上するため、機械産業部品の寿命延長や腐食劣化の防止が期待されることから、電子機器および自動車部品などの別分野での活用が期待される。

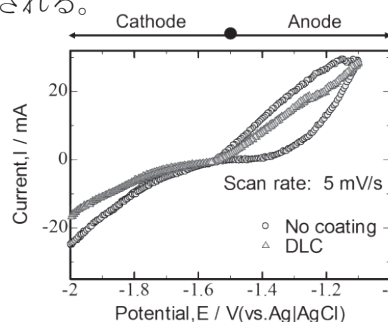


Fig. 1 サイクリックボルタモグラム

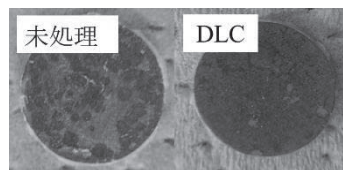


Fig. 2 腐食後の試料表面

DLC 被膜による細胞接着制御：再生医療への応用

工学部 生体医工学科 上村 怜（松宮・中谷研究室），技術科学研究所 中谷達行，岩井良輔
工学部 生命医療工学科 松宮 潔，福山市民病院 藤井泰宏，岡山大学病院 大澤 晋

- セールスポイント： ① 培養表面の細胞接着制御が可能になる
② 細胞の回収が容易になる
③ 細胞へのダメージが低減できる

1. 研究目的

近年、ES細胞やiPS細胞などの幹細胞の研究により再生医療への注目が多く集まっている。これらの幹細胞から人体に移植が可能な組織または臓器を構築するためには、細胞の三次元培養が必要不可欠である。また、三次元培養は癌細胞などに対する創薬研究にとっても欠かせない。三次元的に細胞を培養する手法として細胞培養表面に親水性ポリマーなどのコーティングを施すことで細胞の接着を抑制しているものが多い。しかし、既存の培養容器ではコーティングが剥がれやすかったり、細胞の接着の抑制が不十分であったりするなどの問題点がある。本研究では、細胞培養表面上にダイヤモンドライクカーボン (DLC) をコーティングすることにより播種した細胞を浮遊状態で培養し、三次元スフェロイド形成の可能性を検証することを目的としている。

2. 実験方法

DLC成膜には低温での成膜が可能な高周波プラズマCVD装置を用いた。成膜条件は、到達真空度 7.0×10^{-3} Pa、プロセス圧力5 Pa、メタンガス流量10 sccm、出力は10 W、20 Wとし、処理時間5分とした。基板温度は樹脂へのダメージが少ない50℃前後となる。細胞接着の評価では増殖スピードの速いHela細胞を用い、24孔のポリスチレン製の組織細胞培養用マイクロプレートで培養した。未処理とDLCコーティングを施したマイクロプレートの培養表面に細胞を播種し、播種から2時間後と24時間後の細胞の様子を観察した。播種密度の条件は15000 cells/cm²、30000 cells/cm²、60000 cells/cm²とした。

3. 結果および考察

Fig.1に培養してから2時間後の細胞の様子を示す。Fig.1 (a)は未処理、Fig.1 (b)は出力10 WでDLCコーティングを施したものである。細胞の播種密度はどちらも60000 cells/cm²である。Fig.1 (a)では細胞が伸展しているが、Fig.1 (b)では伸展が見られない。異なる出力、播種密度でも同様の結果を得ることができた。細胞は培養表面に接着すると仮足を伸ばし伸展し、球形から平形に変形するという報告がある。このことから、DLCコーティングが細胞の培養表面への接着を抑制していることがわかった。これらの結果から、DLCコーティングを施した培養表面は細胞接着制御を可能とし、三次元スフェロイド形成の可能性が示唆される。さらに、細胞回収時の細胞へのダメージの低減も期待できる。

4. 応用先

DLC膜は生体材料として優れた特性を有しており、医療デバイスに用いる医療材料への血液適合性や組織適合性の付与が期待されている。また、DLCのもつ抗バイオフィルム性についての研究もされており、菌やウイルスなどの繁殖を防ぐ表面処理としても注目されている。安全性の高い医療を目指すうえで、DLCは欠かせないものになってくると考えられる。

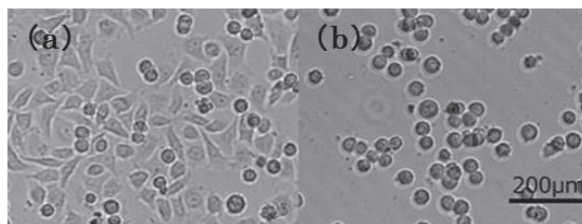


Fig. 1. 播種から2時間後の細胞の様子

医療用樹脂チューブ内面への DLC 成膜技術の開発

岡山理科大学 技術科学研究所 中谷達行, 岡山大学病院 大澤 晋
福山市民病院 藤井泰宏, ストローブ(株) 今井裕一

- セールスポイント: ① 人工血管内面の生体適合化が可能になる
② 医療用チューブ長さ 150 cm まで成膜を確認した
③ チューブ内面に親水性や疎水性の機能性付加ができる

1. 研究目的

血管外科領域において, 血管疾患は動脈硬化, 血管炎など増加傾向にある. そのため, 外科的治療として血管の移植を必要とする症例も増加し, 人工血管の需要が増加している. 人工血管の素材である ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) は血液適合性が高いが, 直径が 6 mm 未満の小口径の場合は, 吻合部の内膜肥厚により閉塞 (開存率が悪い) するという問題があり小口径への使用に制限がある. これまでに, 我々は細管内面コーティング用の交流高電圧バーストプラズマ化学気相成長法を開発し, DLC (Diamond-like Carbon) 膜の成膜に成功している. 本研究では, ePTFE 人工血管の内面に DLC 膜をコーティングし, 生体親和性に及ぼす影響について動物実験により調査を行ったので報告する.

2. 実験方法

成膜は交流高電圧バーストプラズマ化学気相成長法を用いた. 使用したプラズマ電源は電圧発生器と増幅器から構成され, 電圧 10 kV, 電流 10 mA, 周波数 5 MHz まで可変が可能である. 真空到達度は 2.6×10^{-3} Pa 以下, DLC 膜の成膜条件は交流電圧 5 kV, 周波数 10 kHz の一定条件とし, 電極を人工血管の一方のみに設置し, チェンバーを接地電極として電圧を印加した. 膜の密着性を向上させる目的で増幅器にてオフセット負電圧 2 kV を設定した. 原料ガスには CH_4 ガスを使用し, 流量は 96 sccm, 圧力 39 Pa とした. 試料には内径 4 mm, 全長 150 mm のゴアテックス社製 ePTFE 人工血管を用い, イヌの頸動脈人工血管置換術を施行, 通常のエPTFE人工血管と生体反応性の違いを比較検討した.

3. 結果および考察

プラズマの生成は真空管内のグロー放電と同じ原理で, 交流高電圧を電極に給電することで, チューブ内外の圧力差を利用し電極側からチューブ終端に向け CH_4 プラズマが生成される. この細管内の CH_4 プラズマにより人工血管の内面に DLC 膜が堆積される.

Fig. 1 に DLC 膜をコーティングした ePTFE 製人工血管の病理学的評価の結果を示す. DLC コーティングした ePTFE の方が非常に薄く均一な血管内膜が内面に張っているのがわかる. 未処理の ePTFE は内膜肥厚が不均一で一部内膜が解離 (2 つに割れた) している. 内膜の解離性変化は急性閉塞の原因となるため, やはり小径の人工血管は臨床応用に限界があると考えられる. したがって, DLC 膜は人工血管内の内膜形成に良い影響を与えることが示唆される.

DLC コーティングの予想競合技術は, ヘパリンコーティングが一般的とされるが, これはヘパリン起因性血小板減少症という致命的合併症とアレルギーのリスクがある. DLC 膜に抗異常新生内膜形成性, 抗血栓性, 抗バイオフィルム形成性等で DLC 膜の優位性が証明できれば, 医療用コーティングの技術革新となるものと考えられる.

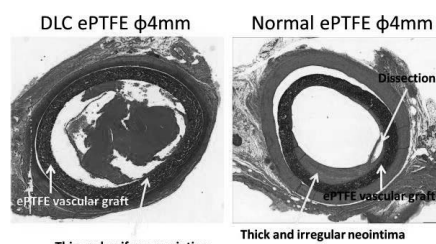


Fig. 1 DLC - ePTFE 製人工血管の動物実験