

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656404

研究課題名(和文)人工血管への応用を目指した多機能バイオインターフェースの構築

研究課題名(英文) Formulation of multifunctional bio-interface that aims at application to artificial blood vessel

研究代表者

扇澤 敏明(Ougizawa, Toshiaki)

東京工業大学・理工学研究科・教授

研究者番号：80262294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：直径5mm以下の小口径人工血管を実現することを目指した。そのモデルであるシート状の延伸ポリテトラフルオロエチレンを用いて、内皮細胞付着の足場であるコラーゲンとの接着力の改善を図った。表面近傍のフィブリルを表面処理により切断しコラーゲンが膜内部に侵入しやすくしアンカー効果を発現させることと、表面に酸素系の極性官能基の導入及び炭素割合の増加による相互作用の増加が重要であった。コラーゲンをイオンビーム処理すると、タンパク質を切断し弱い結合のアミノ酸を除去するためその組成が変化した。内皮細胞は照射量が少ないほどコラーゲンにつきやすいが、アミノ酸組成によって血小板の付着しやすさが変化すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It aimed to achieve an artificial blood vessel of 5mm or less in inside diameter. By using a sheet of expanded polytetrafluoroethylene that was a model material of the artificial blood vessel, the improvement of adhesion with collagen that was an intermediate material for adhesion with the endothelial cell was attempted. The anchor effect by cutting the fibril by the surface treatment and making collagen easy to invade the inside of film was important in the adhesion. An increase in the interaction by the introduction of the polarity functional groups with oxygen and an increase in carbon ratio were also important. When the collagen was processed by the ion beam, the composition of amino-acid has changed to remove the amino-acids of weak bonding from the protein. Though the endothelial cell is easily bonded to collagen, it is considered that the adhesion of platelet to collagen changes by the change in the amino-acid composition as an increase in the amount of ion beam irradiation.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・構造・機能材料

キーワード：人工血管 ePTFE 表面処理 コラーゲン バイオインターフェース

1. 研究開始当初の背景

現在人工血管としては内径 6mm 以上のものが使用されているが、これより小口径の人工血管についてはたいへん重要であるにもかかわらず未だに実用化されていない。これは、人工血管内面に血小板が粘着・凝集することにより血栓が生じたり、内膜肥厚が生じたりすることにより閉塞に至るためである。比較的口径の小さい人工血管には延伸ポリテトラフルオロエチレン (ePTFE) 製のものが多く使われているが、ePTFE は血小板の粘着・凝集を抑制するための血管内皮細胞が付着しにくい材料である。それゆえ、内皮細胞付着の足場であるコラーゲンを ePTFE 表面に塗布することが行われている。しかし、やはり未処理の ePTFE にコラーゲンが簡単に接着するわけではないことから、表面処理による接着性の向上が不可欠である。ePTFE の表面処理とコラーゲンとの接着状態との関係を明らかにしその接着を確実にした上で、さらにコラーゲンの表面処理と内皮細胞・血小板との付着現象を明らかにする必要がある。そして、小口径人工血管の実用化へ大きく前進することが重要である。また、このような材料表面の構造・物性と生体分子との相互作用に関するアプローチを人工血管以外の多機能バイオインターフェース創製にも応用していく必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、表面処理を施した高分子基材表面の構造と物性を詳細に分析・評価することによって、細胞接着性向上と血小板吸着抑制のメカニズムを解明し、人工血管への応用が可能なバイオインターフェースの設計指針を確立することである。

具体的には、小口径人工血管として用いられている ePTFE は血管内皮細胞が付着しにくい材料であるため、まず内皮細胞付着の足場であるコラーゲンを ePTFE 上に接着させることを試みる。各種表面処理の有用性を検討し、コラーゲン接着のメカニズムを明らかにする。さらに、塗布されたコラーゲンについてもその表面処理により、血管内皮細胞が接着し、かつ血小板の吸着が抑制されて血栓形成を起こしにくいという 2 つの機能を両立させる表面を形成させるため、それに関する基礎的な知見を得ることである。それらの表面構造や表面物性との関係を解明し、血管内皮細胞を長期間安定に固定でき、かつ血小板の吸着を抑制できるバイオインターフェースの構築の指針を示す。

3. 研究の方法

(1) 人工血管内壁のモデルとしてシート状の ePTFE を用いて、内皮細胞付着の足場であるコラーゲンをまず接着させるため、様々な表面処理 (グロー放電処理、イオンビーム処理 (Ne⁺)、大気圧プラズマ処理 (N₂、He、H₂ 混合ガス)、表面処理剤による処理 (テトラ

エッチ処理)) およびその処理条件の異なる資料を作製する。これらの表面処理を施した高分子基材について、表面形状観察や化学構造・組成の分析を行い、さらに接触角 (表面自由エネルギー)、粘弾性、表面電荷などの物性を評価する。そして、コラーゲンの接着強度などを定量化し、表面物性との相関を検討する。

(2) 次の段階として、ePTFE (あるいは他の基材) 上に付着させたコラーゲンについて、イオンビームで表面処理を行い、表面形状、表面の化学構造・組成の分析を行う。これらの表面の性質と、内皮細胞接着性と血小板吸着挙動との関係について検討する。

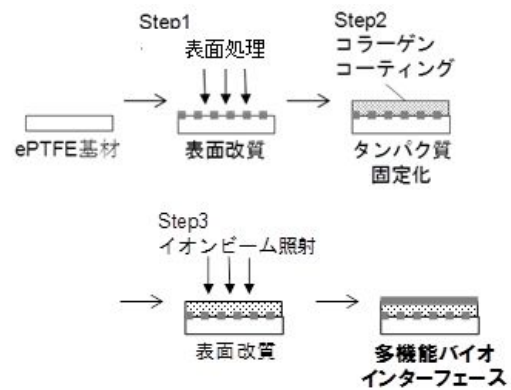


図 1. 表面処理のスキーム

4. 研究成果

(1) 未処理のシート状 ePTFE 試料表面を SEM 観察したところ、延伸により生じた島状のノード部分とノード間を繋ぎ蜘蛛の巣状に発達したフィブリル部分が観察された (図 2(a)). 表面処理試料についても同様に SEM 観察を行ったところ、テトラエッチ処理と大気圧プラズマ処理ではほとんど表面形状に変化はなかったが、グロー放電処理では表面近傍のフィブリルが若干切断され (図 2(b))、イオンビーム処理ではフィブリルが大きく切断されたほかノードの先鋭化が観察された (図 2(c)).

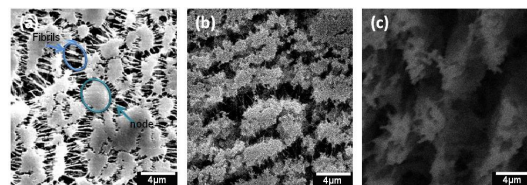


図 2. SEM 写真 (a) 未処理、(b) グロー放電処理、(c) イオンビーム処理

これらの表面処理試料にコラーゲンを塗布した後、その接着強度を剥離試験により評価したところ (図 3)、テトラエッチ処理 > 大気圧プラズマ処理 > グロー放電処理 > イオンビーム処理 > 未処理の順に接着強度が大きかった。また剥離試験後の剥離面の SEM 観察ならびに X 線光電子分光 (XPS) 測定の結果、グロー放電とイオンビーム処理試料ではコラーゲン側に ePTFE が移行しており、界

面剥離ではなく ePTFE 表面近傍の凝集破壊が生じていることが示唆された。これは表面処理により ePTFE 表面近傍が劣化したためであると考えられる。そこで一度剥離試験を行うことで劣化した部分を除去した ePTFE に再度コラーゲンを塗布して剥離試験を行ったところ、グロー放電処理とイオンビーム処理どちらの試料においても接着強度は増加した(図 3)。

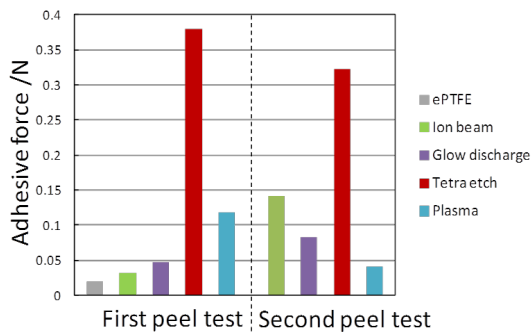


図 3 . 各種表面処理 ePTFE とコラーゲンの接着力

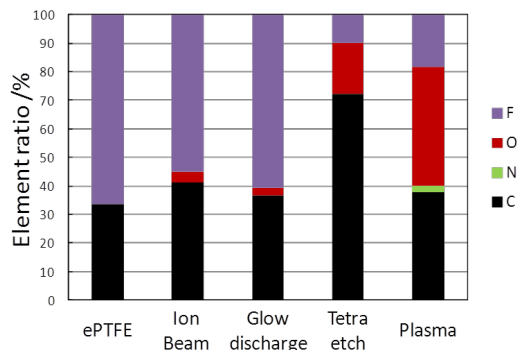


図 4 . 各種表面処理 ePTFE 表面の元素比

各表面処理 ePTFE の XPS 測定の結果から表面元素の存在比率を求めたところ(図 4)、いずれの表面処理試料においても酸素官能基が観測された。これらの表面処理試料では未処理試料に比べて接着強度が向上していることを考慮すると、この官能基の存在により塗布時のコラーゲンの濡れ性が改善され相互作用が強くなったものと考えられる。ここで、イオンビーム処理とグロー放電処理試料表面の酸素官能基の量は同程度であったが、イオンビーム処理の方がグロー放電処理よりも接着強度は大きかった。各試料の表面形状に注目すると、イオンビーム処理試料ではミクロンオーダーの溝が存在しており、これにコラーゲンが入り込むことによるアンカー効果が大きいものと考えられる。一方、テトラエッチ処理試料や大気圧プラズマ処理試料では、示すように剥離後のコラーゲン表面には ePTFE の表面構造が転写されていなかった。したがってアンカー効果はほとんどないと考えられ、表面処理に伴う化学組成の変化により相互作用が増加したことが接着強度向上の主要因と考えられる。特にテトラエッチ処理試料では剥離試験を行った

際に界面剥離部分のほかにコラーゲンの凝集破壊が生じている部分も確認され、他の試料に比べて著しく接着強度が大きかった(図 3)。

そこで両試料を比較することにより、接着強度に対する元素の存在比率や官能基の影響を検討した。テトラエッチ処理試料ではフッ素の割合は大気圧プラズマ処理試料とほぼ同じで、むしろ酸素や窒素といった親水性を付与する元素の割合は少なかった。それに対して炭素の割合が非常に多いため、これが接着強度に大きな影響を与えていると考えられる。接着に対する炭素の効果についての詳細は分かっていないが、コラーゲンの凝集破壊が起こる程に接着強度が向上した部分が存在することを考慮すると、化学的相互作用により共有結合を形成している可能性が考えられる。そこで、図 4 の炭素部分についてピーク分離を行い、化学結合種の存在割合を求めた。その結果、テトラエッチ処理試料では他の表面処理試料に比べて C-C や C=C などの炭化物和カルボニル基の生成量が多かった。このことから処理によって生成した ePTFE 側の不飽和カルボニルとコラーゲンの構成アミノ酸であるメチオニンやリジンが 1-4(Michael)付加をしている可能性がある。このように大気圧プラズマとテトラエッチでは相互作用の様式が異なったために接着強度において差が生じたものと思われる。

以上の結果から、ePTFE とコラーゲンの接着力を改善するには表面処理による劣化層の形成を抑制するとともに、極性官能基導入による表面濡れ性の改善や炭素割合の増加による相互作用の増加、試料表面の凹凸によるアンカー効果発現が重要であることが明らかとなった。

(2)次に、コラーゲン表面にイオンビーム処理を施すことによる効果を探るため、ポリスチレン製シャーレ上に製膜したコラーゲンに対して、イオン種:He⁺、加速エネルギー:150keV、照射量:10¹³、10¹⁴、10¹⁵ ions/cm²で処理を行った。照射量に伴って、試料自身は若干黄色みを帯びてくるが、表面形状については、SEM 観察によって変化はほとんど見られなかった。未照射試料も含めてそれらの表面の化学的な状態について、ラマン分光、二次イオン質量分析(SIMS) XPS により測定した。さらに、剥離させたコラーゲン試料について赤外分光(IR)による測定も行った。ラマン分光や XPS による測定では、照射量に伴う有意な差は観察できなかった。図 5 に SIMS 測定により求めた照射量の変化に伴うコラーゲンを構成するタンパク質のアミノ酸種の割合の変化の結果を示す。照射量によって、アミノ酸の組成が変化しているのがわかる。これは、照射量を増やすと、タンパク質における弱い結合部分を切断し、その部分のアミノ酸を真空中に飛ばし除去するためであると考えられる。また、IR 測定の結果から、照

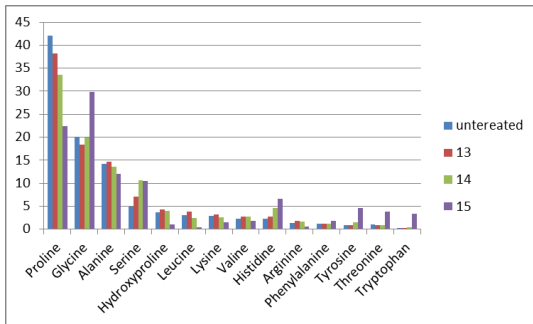


図5．イオンビーム照射量の変化にともなうアミノ酸種の組成変化

照射量の増加に伴って、アミノ基に比べてカルボキシル基の方が減少していた。本来ならば、これらの基は同様に変化していくはずであるが、カルボニルが脱離して、これらの比率が変わった可能性を示唆している。このように、イオンビームの照射量により、コラーゲンに化学的な変化が起こっていることが明らかにされた。これらが内皮細胞接着性と血小板吸着挙動に影響を与えていると考えられる。

先行研究において、内皮細胞は、コラーゲンへのイオンビーム照射量が多くなるほどつきにくくなることが報告されている。本実験試料についても、確認のため、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞を用いてコラーゲンへの接着量の測定を行った。播種後2日目において、未照射の細胞は接着していたが、イオンビーム照射サンプルではいずれも死んで剥がれおちる細胞が多数観察され、照射量が多いほど顕著であった。つまり、コラーゲンへのイオンビーム照射により内皮細胞の接着性が低下することがこの試料においても明らかにされた。血小板の付着については、イオンビーム未照射よりも 10^{14} - 10^{15} ions/cm² では大きく抑えられていたが、 10^{16} ions/cm² となるとまた活性化したことが先行研究で確かめられており、本研究の試料でも同様であると考えられる。コラーゲンにおけるタンパク質のアミノ酸組成の変化に伴って、血小板がつきにくくなる照射量があることが予想されるが、この原因については、未だにわかっていない。

以上から、内皮細胞が付着しやすく血小板が付着しにくいイオンビーム照射量に最適値が存在すると考えられ、それがコラーゲンにおけるアミノ酸組成あるいはアミノ基の量などに依存することが示唆されるが、現在のデータからはその明確な原因をつきとめることはできていない。これを明らかにするためには、生体物質と高分子とのより詳細な関係について生理学的な検討が必要となるものと思われる。その分野の専門家を含めた検討が必要であり、これについては今後の検討課題である。

5．主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計2件)

1. 小口径人工血管用延伸テフロンへの表面処理効果とコラーゲン接着: (東工大院・理工) 石崎樹久、保山敬一、扇澤敏明、(理研)田中俊行、鈴木嘉昭、平成25年度繊維学会秋季研究発表会(2013年9月5日)、豊田工業大学(愛知県)
2. 抗血栓性人工血管の開発を目的とした細胞外マトリックスタンパク質の構築: (東工大院総合理工・東工大院理工*) 西岡宣之、扇澤敏明、三重正和、小島英理、日本化学会第94春季年会(2014年3月29日)、名古屋大学東山キャンパス(愛知県)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
無

6．研究組織

(1)研究代表者

扇澤 敏明 (Ougizawa, Toshiaki)
東京工業大学・理工学研究科・教授
研究者番号: 80262294

(2)研究分担者

小島 英理 (Kobatake, Eiri)
東京工業大学・総合理工学研究科・教授
研究者番号: 00225484

松本 英俊 (Matsumoto, Hidetoshi)
東京工業大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 40345393