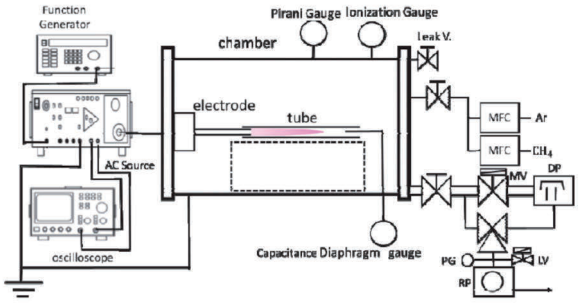
206　DLCによる人工血管開存性の向上の可能性の検討	大澤　晋

【目的】血管外科では、様々な血管の再建手術を行う。狭窄、閉塞した血管の再建には人工血管や大伏在静脈等の採取可能な自己血管を用いる。しかし、径が 6 mm より小さい人工血管では極端に開存率が落ちる問題がある。そこで我々は、Diamond-Like Carbon（DLC）コーティングで人工血管の開存率を上昇させることができないか？検討を重ねてきた。従来、DLC は高い生体適合性を有することは知られていたものの、樹脂にコーティングできない、管状物質の内腔にコーティングできないという欠点があり、人工血管のコーティング素材としては全く検討もされていなかった。しかし、我々は樹脂チューブ内腔に DLC をコーティングする装置を世界で初めて作製し（Journal of Photopolymer Science and Technology 2018;3:373-377 より）、特許を取得（特許第 6506787）、DLC コーティングを内腔に施した DLC コーティング延伸ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）人工血管を作製し、実験動物を使用して動脈置換術と動静脈シャント作製術でその機能を検証した。しかしながら、ePTFE の抗血栓性と DLC コーティングの性能は非劣勢を示すに止まり、DLC の機能向上が必要と判断した。DLC はそのほとんどを炭素と水素からなるアモルファスカーボン被膜である。実際の生体膜には、酸素や窒素を含み、カルボキシル基やアンモニウム基を有する。DLC コーティング時に酸素を付加すると、DLC にカルボキシル基を付加することができる。本研究の目的は、酸素付加 DLC コーティング ePTFE 人工血管は従来の DLC に比べてその血液適合性を向上させるのか？人工血管の開存率を向上させるのか？を確認することである。

【方法】ePTFE 人工血管に酸素付加 DLC コーティングを行う。その成膜条件を最適化して、本研究用の試料を作製する。親水角の確認、DLC コーティング内のカルビキシル基の存在の工学的確認、電子顕微鏡での確認、全血付着試験、血小板付着試験、タンパク付着試験を実施。その後、ヤギを用いた頸動脈置換術を施行し、開存率向上効果を確かめる。

【結果】ePTFE 人工血管 DLC をコーティングする際に、酸素を付加し、カルボキシル基付加 DLC（C-DLC）を ePTFE 人工血管内腔にコーティングすることに成功した。作製した DLC コーティングの存在と、カルボキシル基の導入の成功、成膜の均一性を確認できた。親水角は有意に低下し、人工血管内腔表面の親水性の向上を確認した。血小板付着試験では血小板付着は、通常の ePTFE＞従来の DLC コーティング ePTFE＞C-DLC コーティング ePTFE であった。アルブミン吸着は通常の ePTFE＜従来の DLC コーティング ePTFE＝C-DLC コーティング ePTFE であり、これらは血液適合性の向上を示唆する所見であった。しかし、全血接触試験では *in vitro* ヒト全血試験で有意な白血球などの有核細胞の付着増加を認め、*in vivo* ラット全血で明確な血栓形成傾向を認めた。Fibrinogen 吸着試験では C-DLC で有意な吸着増加を認め、全血試験の免疫染色では DLC 表面に薄い Fibrin 層が存在しており、Fibrin 付着が親水性上昇、Alb 吸着上昇、血小板付着抑制といった血液適合性向上効果を打ち消しているモノと思われた。残念ながら、動物植込み試験に移ることは意味が無いと考え、DLC へのアンモニア基付加の研究に着手した。カルボキシル基＋アンモニア基によって、表面をニュートラルに戻すことで全血付着を抑制し、さらに生体に構造に近づける Biomimic な DLC の開発に着手している。

状物内腔への DLC コーティング装置



206. DLC による人工血管開存性の向上の可能性の検討

大澤　晋

岡山大学病院 心臓血管外科

Key words：Diamond-like carbon，人工血管，extended polytetrafluoroethylene，血液適合性，カルボキシル基

緒　言

1. 人工血管の現状

血管外科手術では、人工血管や大伏在静脈等の採取可能な自己血管を用いて血管の再建を行う。一般的に、大動脈や径が 6 mm 以上の比較的大きな動脈再建にはダクロンや延伸ポリテトラフルオロエチレン（ePTFE）素材の人工血管を用い、良好な成績を得ているが、径が 6 mm より小さい人工血管では極端に開存率が落ちる問題がある。6 mm 未満の比較的細い動脈の再検やバイパス術や透析シャント作製では、極力自己の静脈を用いて血行再建を行うが、適当な大きさと質の自己静脈が無いときは人工血管を用いる。現在のところ、血栓症が閉塞原因として問題になりやすい細径の動脈の血行再建には ePTFE 素材の人工血管を用いる。また、さらに細径の心臓の動脈や四肢末梢の動脈への血流再建は人工血管の使用はほぼ禁忌であるなど、人工血管については血栓形成性、吻合部狭窄の観点からの解決すべき課題は多い。

2. 医療用コーティングとしての Diamond-like carbon の有用性

Diamond-like carbon（DLC）コーティングは次世代の医療用コーティング素材、特に生体植込み型医療機器に対するコーティング素材として、非常に有望であると考えられる。その理由としては、①低アレルギー性（ほぼ無いものと考えられる）、②低炎症性、③多様な開発が可能（簡単な修飾で容易に性質を転換できることによる臓器別生体適合性を付与できる可能性が高い）、④低コスト性（従来の有機コーティングに比べてコーティングコストは安い）、⑤強靭性、⑥半永久の耐腐食性、⑦極薄（数 10 nm 単位の厚さ）、等の利点が考えられる。しかし、これまでは樹脂へのコーティング技術、管状物内腔へのコーティングの技術が発達してないことから、人工血管への応用研究はほとんどなされていない。

3. 国内外の研究状況

人工血管の開存率の問題を解決する方法は大きく分けて以下の 2 通りである。

① コーティングや素材を改良し、血栓性形成性や炎症性反応を抑制して異常な肉芽形成を抑制する。

② 再生医療で自分の血管を再生し、それを植え込む。

①に関しては、素材はこの 30 年間、大きな進歩がない。現状で唯一製品化されている抗血栓性コーティング素材はヘパリンコーティングであり、ヘパリンの抗血栓性を利用して、血栓形成を従来の人工血管より抑制することができ、末梢動脈用 ePTFE 素材の人工血管に応用されている。しかし、ヘパリン起因性血小板減少症という重篤な合併症やアレルギーの懸念が存在することに加え、著しい機能向上が得られたとは言えない [1]。DLC はアレルギーや薬剤性副作用が無い点で、同等の抗血栓性を有するならば、大きな優位性を持つことになる。

②に関しては、多くの機関で研究がおこなわれているが、未だに従来の人工血管以上の再生血管を作製し、実用化した例はない。研究開発のハードルが非常に高く、開発しても再生血管作製は高コストで作製時間もかかるものと考えられる。また、成人に関しては、成長を考慮する必要がなく、高開存率の人工血管があればあえて再

生血管を使用する状況は非常に限られる。

4. 研究の現状

我々の研究室では、DLC コーティングの医療応用を促進する研究を進めており、特に人工血管への応用研究を進めている。DLC はプラズマで育成され、コーティング時に高温になること、管状物内部にプラズマを安定して発生させることができず、人工血管の様な筒状の物の内部にはコーティングする技術が無いことが問題であった。そこで、まず我々は、世界で初めて人工血管内部へのコーティング技術の確立を試み、長さ 2 mm 以上の樹脂チューブ内腔（径 3 mm までは少なくとも可能）に安定的にプラズマを発生させ（図 1）、DLC をコーティングすることに成功した。また、これまでの内外の研究では、異物に対する生体内の血栓形成性は親水性であるほど低くなると言われており、我々はより親水性の高い、酸素付加 DLC（C-DLC）を新たに開発し、本研究の着想に至った。

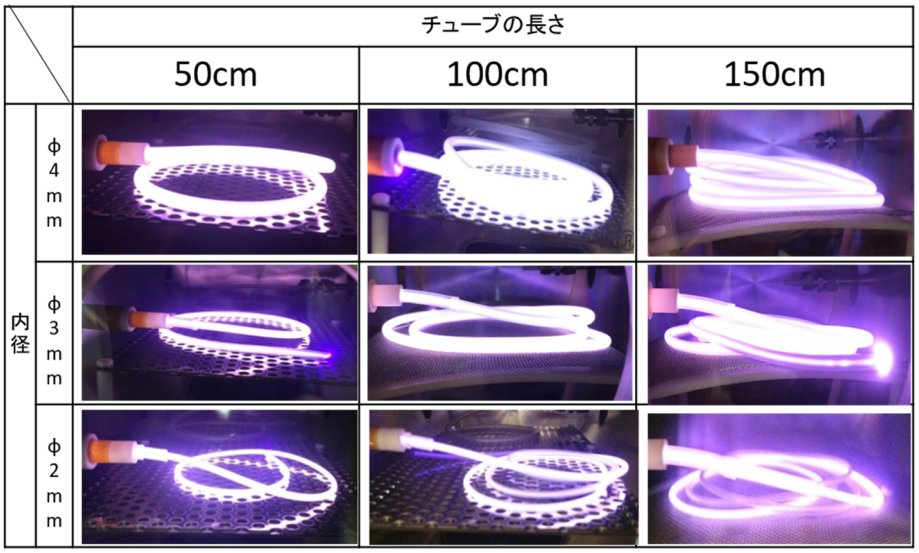


図 1. チューブ内腔に対する DLC コーティング
樹脂チューブ内腔に安定的にプラズマを発生させて、DLC もしくは、O-DLC コーティングを行った。現在の所、2.0 m まで、安定的な膜厚で DLC コーティングを樹脂チューブ内腔に施すことが可能であることを確認している。

方　法

本研究は、市販の ePTFE 人工血管（内空直径 4～5 mm）を用いて行った。本研究は、C-DLC コーティングを開発・成膜条件調整を行い、作製した C-DLC で内腔をコーティングして ePTFE 人工血管を用いて、コーティングの物性試験、血液適合性試験を行った。当初計画では、実験動物への植え込み実験を予定していたが、後述の理由により、実験動物への植え込み実験は試行を延期している。

1. C-DLC の作製

DLC 膜は当研究チームが開発した既報の方法に従い施行する［2］。本邦を改変して、酸素付加（カルビキシル基付加）DLC を作製し、その成膜条件を最適化する。

2. DLC コーティングの物性試験

作製した DLC コーティング ePTFE 人工血管を用いて、通常の ePTFE 人工血管と DLC コーティングを比較

検討した。C-DLC コーティングについては後述の理由により、血小板付着試験、蛋白吸着試験、動物での人工血管植え込み試験は施行していない。

1） 親水性の評価：コーティング材料における、ぬれ角の評価を行う。
2） DLC のゼータ電位の測定。
3） 得られた DLC の構造解析。DLC の分類。
4） 表面の平滑性の評価：電子顕微鏡による観察。
5） 全血付着試験：動物全血、ヒト全血を DLC コーティング ePTFE に接触させ、血栓形成量、白血球等の有核細胞付着の状況、フィブリノーゲン付着の状況を観察し、比較検討する。
6） 血小板付着試験：ヒト静脈血を使用し血小板の付着量を比較検討する。
7） タンパク吸着試験：アルブミン、フィブリノーゲン、ヒト血漿を用いてタンパク付着の程度を比較検討する。
8） 実験動物での人工血管植え込み試験：ブタ、ヤギ、ラット。

結果および考察

1. 酸素付加 DLC の開発と条件設定の調整

開発した酸素付加 DLC（カルボキシル基付加 DLC）の条件の最適化を行った。水接触角が最も小さくなる（親水性の官能基が多い）条件を模索したところ、DLC コーティング後の酸素プラズマ処理を 2 秒とすると最も水接触角が小さくなることが確認された。最初は、カルボキシル基の付加効率にかなりばらつきが多かった。それは、プラズマにより生成された酸素ラジカルが DLC をエッチングしてしまい，DLC が消失して地肌が出ている箇所があるためであると確認された。これを改善できる酸素プラズマ条件を明らかにし、カルボキシル基の付加効率を安定させることに成功した［3］。

1. DLC コーティングの物性試験

1）親水性の評価

ぬれ角は通常の ePTFE＜従来の DLC＜O-DLC であった［3］。本結果による、O-DLC は従来の DLC より親水性が向上しているといえた。一般に、親水性コーティングはタンパク付着を抑制し［4］、血栓付着を予防すると言われるが、ワイヤーでは血栓付着を予防するが、カテーテルでは血栓付着を増加させる［5］といった報告もあり、親水性＝血栓形成予防と単純に結論づけることはできない。

2）ゼータ電位の測定

ゼータ電位は従来の DLC に比べて、マイナスに振れることがわかった。ゼータ電位はニュートラル（0 に近い）方が、血液適合性は良い可能性が高く、本変化は血液適合性にはネガティブに働く可能性が示唆された。ただし、酸素ブラズマ処理 1 秒で最もゼータ電位はマイナスとなり、酸素プラズマ処理を長くするとゼータ電位はニュートラル方向に再度傾く現象が確認されている［3］。

3）得られた C-DLC の構造解析

全電子収量法を用いて炭素原子 K 端の吸収端近傍微細構造解析（NEXAFS）、ラザフォード後方散乱分析（RBS）、弾性反跳検出分析（ERDA）、分光エリプソメトリー、ナノインデンテーション法による硬度測定にて、膜の構造解析を施行した。その結果、堆積した DLC 膜に不純物はほとんどなく、DLC の構造は，水素化アモルファスカーボンに分類されながら、硬さは，ポリマー状炭素（PLC）に分類されるという驚くべき結果を得た。これは、従来の DLC 分類法では当てはまるカテゴリーがなく、新種の DLC である可能性が高いことが示唆された［3］。

4）表面平滑性の評価

電子顕微鏡での観察では、ePTFE の既存の Fiber 構造を壊すことなく、C-DLC を ePTFE にコーティングできていることが観察できた。通常の ePTFE と比べて、従来の DLC と同等レベルに ePTFE 繊維を平滑化できることを確認できた（data not shown）。平滑性の向上は、血液適合性が向上する可能性を示唆する所見である。

5）全血付着試験

血液適合性の程度のスクリーニングとして、*in vitro* のヒト全血付着試験及びラットを用いた全血付着試験を施行したところ、C-DLC コーティング ePTFE は通常の ePTFE や従来の DLC コーティング ePTFE より血栓付着が著しく増加した。特にラットを用いた *in vivo* での血栓付着が C-DLC で有意に高度であった。従来の DLC の有無では血栓付着に明確な違いはなかった。原因としては、C-DLC ではフィブリン層が DLC 表面に明確に分厚く堆積しており、フィブリンの付着が血栓形成性を増加させたと予想された。この結果をもって、C-DLC は血液適合性向上よりも、むしろ血栓形成を促進させてメリットのある、血管塞栓コイルなどへの用途が実用化には敵していることが判明した。わずか数秒の酸素プラズマ処理で、ここまで劇的な血液反応性の変化が得られることは非常に興味深く、DLC の医療応用の範囲の拡大を予想させるものであった。本結果をうけて、C-DLC は血液適合性向上目的には使用できず、以下の血小板付着試験とタンパク付着試験の意義は乏しいため、対象外とした。酸素付加のない DLC は DLC コーティングのない ePTFE に対して非劣勢であった［6］。

6）血小板付着試験

ヒト血漿による、血小板付着試験を施行したところ、血小板付着のカウント、面積とも、通常の ePTFE＜DLC コーティング ePTFE であった。酸素付加無しの従来の DLC の血液適合性にプラスの所見であった［6］。

7）タンパク付着試験

吸着試験では、従来の DLC は、ePTFE のアルブミン吸着を有意に増加させる結果を得た。アルブミンが非変性状態で吸着した材料表面は高い抗血栓性を有することが知られており、本結果は血液適合性を向上させる可能性を示唆する。一方、フィブリノーゲン吸着試験では、従来の DLC はフィブリノーゲン吸着を約 2 倍に上昇させており、こちらは血液適合性の減少を示唆した。Alb／Fib 比は大きく変化しておらず（大きいほど抗血栓性といわれる）、強く血液適合性が向上させることを示唆するものではなかった［6］。

8）実験動物での人工血管植え込み試験

C-DLC は血液適合性試験で劣勢であったが、DLC は ePTFE に対してどのような位置付けであるのか？ブタの動脈置換術による短期血液接触試験（拍動流）、ブタの頸静脈置換術による短期血液接触試験（定常流）、1.5 mm の人工血管によるラット腹部動脈置換試験（7 日間生存）、ヤギ頸動静脈シャントによる長期生存試験（8 週間生存）を行った。ブタの短期血液接触試験では、動脈置換、静脈置換ともにマクロの観察、ミクロの観察で特に DLC と DLC なしで ePTFE 内腔表面への血液適合性に変化は認めなかった。また、ラットを用いた小径人工血管による腹部大動脈置換術では 7 日間生存で開存率に有意差は認めなかった（DLC 66%（4／6）vs uncoated 60%（3／5）、P=1.000）が、人工血管内腔への血栓量は DLC で多かった。また、ヤギで施行した ePTFE 人工血管動静脈シャント作製試験では、開存率に差は無い（DLC 100%（6／6）vs uncoated 83%（5／6）、P=1.000）かった。ヤギの長期開存実験では吻合部の肉芽形成が高度であり、実験モデルとしては問題であった。この 4 つ足大動物における人工血管吻合部狭窄は、動静脈吻合部のどちらにも発生し、長期の開存試験の評価を難しくするものと考えられた。高度な狭窄があるものの、シャント内血栓はほとんど認められなかった［6］。

3. まとめ

以上の様に、我々の育成する DLC の ePTFE への効果は、血液適合性の面ではほぼ同等、小径の人工血管に使用するなど特殊な状況ではやや落ちるというレベルであることが証明された［6］。ePTFE は現在存在する人工血管素材では、最高レベルの血液適合性を有するため、DLC が高い血液適合性を有するという事は明確になったが、ePTFE の血液適合性をさらに向上させて、細径の人工血管の血栓形成を減少させる、人工血管透析シャントの開存率を向上させるという効果は得にくいのでは無いかと考えられた。血液適合性の乏しい物質を ePTFE 並みに上げる、血液適合性を下げないで DLC で付加機能を基材につけるという用途は考えられると思われる。今後の検討が必要である。

共同研究者・謝辞

DLC コーティングは共同研究者である岡山理科大フロンティア理工学研究所の中谷達行教授に施行していただいた。中谷教授には、本研究において、数多くのご助言とご助力を頂き、心より感謝申し上げます。

文　献

1) Dorigo W, Pulli R, Castelli P, et al. A multicenter comparison between autologous saphenous vein and heparin-bonded expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) graft in the treatment of critical limb ischemia in diabetics. J Vasc Surg. 2011 Nov;54(5):1332-1338. doi: 10.1016/j.jvs.2011.05.046. PMID: 21840151.

2) Nakatani T, Imai Y, Fujii Y, et al. Novel DLC coating technique on an inner-wall of extended polyterafluoroethylene vascular grafts using methane plasma produced by AC HV discharge. J Photopolym Sci Tech 2018;31(3):373-377. doi: 10.2494/photopolymer.31.373

3) Imai Y, Fukue H, Nakatani T, et al. Biomimetic diamond-like carbon coating on a lumen of small-diameter long-sized tube modified surface uniformly with carboxyl group using oxygen plasma. J Photopolym Sci Technol 2022;4:289-97. doi: https://doi.org/10.2494/photopolymer.35.289.

4) Tunney MM, Gorman SP. Evaluation of a poly(vinyl pyrollidone)-coated biomaterial for urological use. Biomaterials 2002 Dec;23(23):4601-8. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00206-5. PMID: 12322981.

5) Leach KR, Kurisu Y, Carlson JE, et al. Thorombogenicity of hydrophilically coated guide wires and catheters. Radiology 1990 Jun;175(3):675-7. doi:10.1148/radiology.175.3.2343111. PMID: 2343111

6) Goyama T, Fujii Y, Muraoka G, Nakatani T, Ousaka D, Imai Y, Kuwada N, Tsuji T, Shuku T, Uchida HA, Nishibori M, Oozawa O, Kasahara S. Comprehensive hemocompatibility analysis on the application of Diamond-like carbon to ePTFE artificial vascular prosthesis. Sci Rep. 2023 May 24;13(1):8386. doi: 10.1038/s41598-023-35594-7. PMID: 37225824