



HOKKAIDO UNIVERSITY

| | |
|------------------|---|
| Title | 反応性スパッタリングで蒸着したアルミナ薄膜の抗血栓性に関する基礎的研究 : 蒸着時における酸素分圧の影響 |
| Author(s) | 菊田, 幸明; Kikuta, Yukiaki; 中兼, 雅之 他 |
| Citation | 北海道大學工学部研究報告, 161, 55-62 |
| Issue Date | 1992-10-16 |
| Doc URL | https://hdl.handle.net/2115/42319 |
| Type | departmental bulletin paper |
| File Information | 161_55-62.pdf |



反応性スパッタリングで蒸着したアルミナ薄膜の
抗血栓性に関する基礎的研究
— 蒸着時における酸素分圧の影響 —

菊田幸明* 中兼雅之** 西村生哉*
見藤歩* 村林俊* 勇田敏夫*
(平成4年6月30日受理)

**A primary study of the antithrombogenesis of deposited Alumina film
by reactive sputtering**
— Effect of oxygen partial pressure in sputtering —

Yukiaki KIKUTA, Masayuki NAKAGANE, Ikuya NISHIMURA,
Ayumi MITOH, Shun MURABAYASHI and Toshio YUHTA
(Received June 30, 1992)

Abstract

In this paper the antithrombogenesis of Alumina film by reactive sputtering in vitro test was described. It has long been known that artificial surfaces activate components of the blood, both cellular and plasmatic.

We have focused our attention on the biocompatibility of Aluminas to be applied on artificial heart valve. Then we suggested that the Alumina ceramics had the same blood compatibility as silicon rubber. However, it is not easy to produce heart valves of Alumina ceramics because they are very hard materials. If an endureable material can be coated with an Alumina film, it may have a good blood compatibility. Therefore we studied about the interaction of Alumina films.

To observe effects of oxygen partial pressures, several Alumina films were deposited on glass substrates by reactive sputtering and examined the interaction with blood in vitro tests. Activation of the intrinsic coagulation system was estimated based on Kallikrein activity. The platelet reactivity was estimated by using scanning electron microscopic examinations. The results showed it had no effect on the intrinsic coagulation system and 10% oxygen partial pressure was reasonable in the platelet reactivity.

1. はじめに

医用材料は生体組織と接触して用いられるため、生体との馴染み(生体適合性)は重要な特性

* 生体工学専攻 生体機能合成工学講座

** 特リクルート

のひとつである。特に、人工弁、人工血管などの人工臓器において、材料の血液適合性は非常に重要な問題である。一般に、このような人工物に対する異物反応は、血液と接触する材料界面における内因凝固系、血小板系、補体系の活性化によって生じるものと考えられている。

従来より、我々は人工弁への応用を目的として、生体親和性に優れたアルミナの抗血栓性について検討を行い、シリコンと等しい優れた血液適合性を有していることを明らかにしてきた¹⁾。しかしながら、アルミナはセラミックスであるため、人工弁への応用においては、難加工性、脆性などの問題が危惧される。したがって、これらの問題を解決するため我々は反応性スパッタリングで生成された、アルミナ薄膜による金属材料の表面改質を試みている。本研究では、反応性スパッタリング時の酸素分圧（ここでは、パーセントで定義）に対するアルミナ薄膜の抗血栓性への影響について In vitro 実験で基礎的な検討を行ったので報告する。

2. 血栓形成と人工物表面

これまでの多くの研究によって、血液凝固反応に関する基本的な機序が明らかになってきた²⁾。特に、一連の血液凝固反応は、図1で示す初期の吸着反応が重要と考えられている³⁾。中でも、材料表面における血漿タンパク質の吸着は、血栓形成において極めて重要な役割を果たし、吸着する血漿タンパク質の種類によって第 X II 因子（内因系凝固因子）の活性化および血小板の粘着反応が左右されることが知られている⁴⁻⁶⁾。

血液中には、フィブリノーゲンと呼ばれる血漿タンパク質が2～3 mg/ml 程度含まれている。フィブリノーゲンにトロンビン（タンパク質分解酵素）が作用することでフィブリンが生成される。このフィブリンが酵素 X III a の働きによって橋かけされてフィブリンの網目となり、血球成分を取り込んで血栓を形成する。また、トロンビンは前駆体であるプロトロンビンに第 Xa 因子などが作用して生成されたものであり、第 Xa 因子はその前駆体である第 X 因子が別の酵素によって活性化されたものである。このようなカスケード反応によって、必要な活性化酵素が雪だ

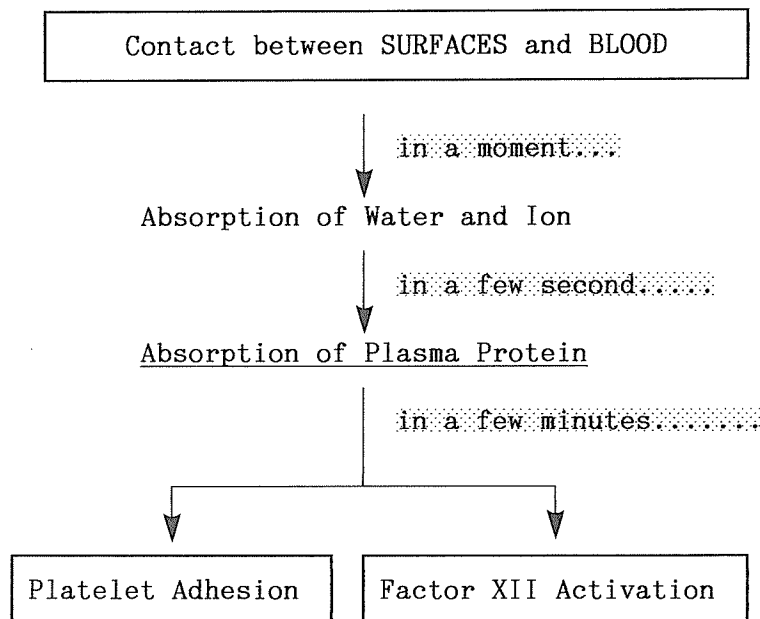


Fig. 1 Initial reaction in contact between artificial surfaces and components of the blood

るま式に増加して最終的に架橋フィブリンが生成される。特に、このカスケード反応は第 X II 因子の活性化が引金となって開始され、このとき高分子量キノーゲン、プレカリクレインおよびカリクレインなどのタンパク質が活性化に関与すると考えられている。

血小板は無核の細胞であり、血液中に $20\sim 50\times 10^4$ 個/mm³ 含まれている。血小板が刺激を受けると、異物表面に偽足を出しながら粘着し、さらに多数個の血小板と融合して凝集塊を形成する。また、血小板から種々の物質が放出される。放出物質中には、セロトニン、カルシウムイオン、ADP (Adenosine diphosphate), PF 3 (Platelet factor 3) などが含まれており、これらの物質が放出されることで、さらに血小板の形態変化、粘着、凝集が進行する。

3. 実験方法

3.1 反応性スパッタリングによるアルミナ薄膜の作成

アルミナ薄膜の成膜は、予めクロム酸混液で洗浄、乾燥したガラス基板上行った。内因系凝固反応実験では、試料の接触面積 (約 20 cm²) を大きくするため、基板にはガラスビーズ (直径 0.2~0.25 mm) を使用し、血小板反応実験ではスライドガラスを 13 mm 角に切り出したものを使用した。反応性スパッタリングによるアルミナ薄膜の成膜は、RF 電力 100 W、全圧 0.3 Pa、酸素分圧 5, 10, 20% の各条件で行った。成膜には、高周波マグネトロンスパッタリング装置 (日電アネルバ社製 SPF-332 H) を使用した。

3.2 アルミナ薄膜の組成分析

アルミナ薄膜の組成分析は、X 線光電子分光法により測定を行なった。測定は結合エネルギー 0~1000 eV の範囲でワイドスキャンを行い、重要と思われる元素について詳細なスキャンを行い各アルミナ薄膜の組成比を求めた。すなわち、蒸着膜の化学組成は、Al 2s, O 1s, C 1s 軌道から放出される原子のエネルギースペクトルを測定し、Al 2s, O 1s におけるスペクトルの積分強度比から推定 (このとき、表面汚染層の影響を取り除くために C 1s の結合エネルギーを 285.0 eV として校正した。) を行なった。なお、測定には ESCA-III (Vacuum Generator 社製) を使用した。

3.2 内因系凝固因子の活性化に関する実験方法

本研究では、内因系凝固の活性化評価として、カスケード反応の引金となる第 X II 因子の活性化について観察した。実験は合成ペプチド基質法⁷⁾を用いて、第 X II 因子の活性化をカリクレイン量の測定を行って評価した。合成ペプチド基質法は、第 X II a 因子 (活性化された第 X II 因子) によってプレカリクレインが活性化されてできたカリクレインを発色性のある合成ペプチド基質と反応させ、分光光度計で発色したカリクレインの吸光度を測定する方法である。これより、間接的に第 X II a 因子の量を評価することが可能となる。

図 2 に合成ペプチド基質法による内因系凝固反応に関する実験手順を示す。ガラスビーズ上に成膜したアルミナ薄膜試料をヒト標準血漿に入れ、血漿中に存在する阻害タンパク質による失活反応を抑制するために、0℃で 60 分間培養した後、トリス塩酸緩衝液で希釈を行った。希釈したヒト標準血漿に合成ペプチド基質液 (Kabi 社製、発色性合成基質 S-2302 テストチーム) を入れ、37℃で正確に 10 分間培養を行い、酢酸を加えて反応を停止させたのちに反応した合成基質の吸光度 (波長 405 nm) を分光光度計 (日本分光社製、Ubest-50) を用いて測定した。

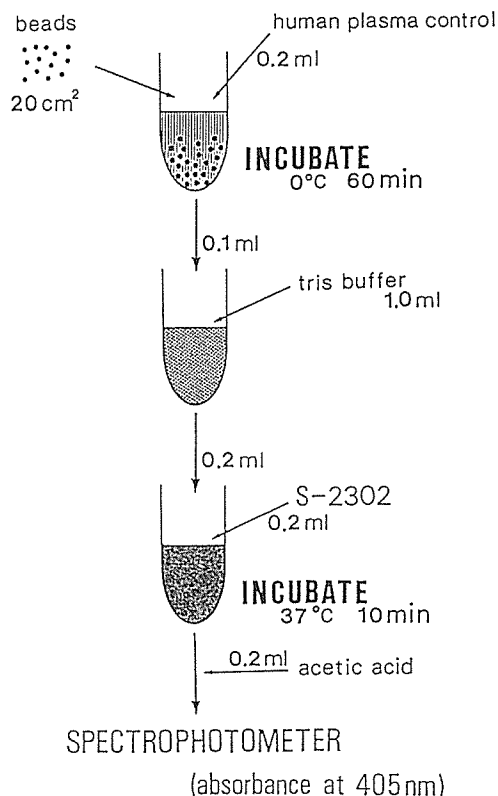


Fig. 2 Experimental flow chart on intrinsic coagulation (Kallikrein activity) in vitro test

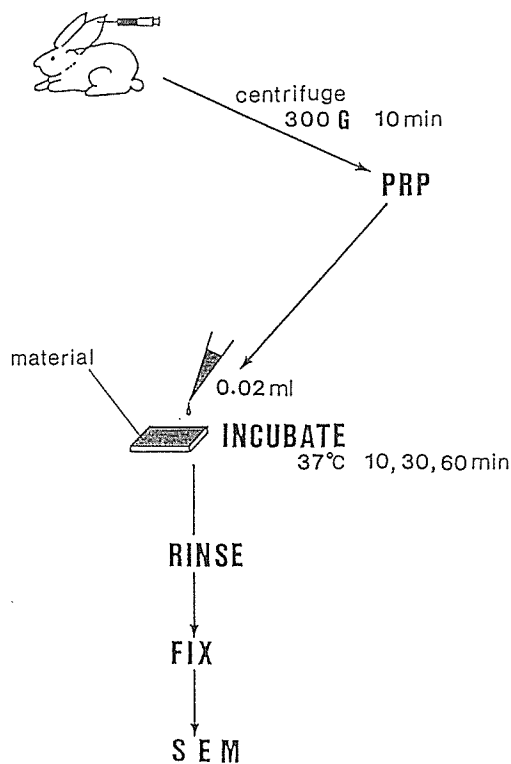


Fig. 3 Experimental flow chart on Platelet reactivity in vitro test

3.3 血小板反応に関する実験方法

図3に血小板反応に関する実験手順を示す。採血にはうさぎを使用し、採血後直ちに3.8%クエン酸ナトリウム水溶液（クエン酸ナトリウム水溶液1に対して血液9の割合）を加えて血液凝固反応を阻止した⁷⁾。その後、採血した血液を遠心分離（300 G, 10 min）してPRP（Platelet Rich Plasma）を作成し、PPP（Platelet Poor Plasma）で希釈しPRP内の血小板数を 7×10^5 cells/mm³程度に調整した。調整したPRPをプレバート基板上に酸素分圧を変化させて成膜したアルミナ薄膜に滴下し、37°Cで60分間培養した後、生理食塩水で洗浄してグルタルアルデヒドで粘着した血小板の固定化を行った。さらに、固定化した各試料を臨界点乾燥させて走査型電子顕微鏡（SEM, 日本電子社製, JSM-T 20）で試料上の血小板の観察を行った。

4. 実験結果

4.1 アルミナ薄膜の組成分析

表1に実験で使用した各アルミナ薄膜試料のX線光電子分光法による組成分析結果を示す。結果より、アルミニウム原子に対する酸素原子の組成比には、酸素分圧の違いによりばらつきがあることが分かる。これより、酸素分圧5%のアルミナ薄膜で最も単結晶アルミナの組成比に近いことが示されている。また、酸素分圧20%のアルミナ薄膜では、単結晶アルミナの組成比より10%程度少なく、酸素分圧10%のアルミナ薄膜では、20%程度少ないことが示されている。

4.2 内因系凝固因子の活性化

図4に、ガラスビーズのみを用いたときの経時的なカリクレインの吸光度変化について示す。これより、ガラスビーズとヒト標準血漿との培養後60分までは、経時的に吸光度は上昇し、第XII因子の活性化が進んでいることが示されている。また、培養後60分以後、120分および180分ではカリクレインの吸光度はほとんど変化が見られないことから、本研究では内因系凝固因子の活性化反応時間を60分と定めて実験を行った。

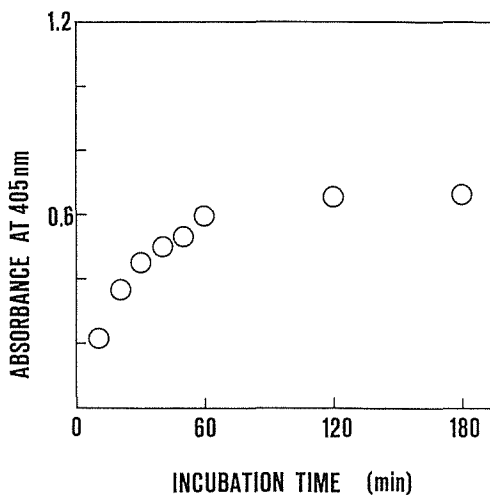


Fig. 4 Time dependence of Kallikrein activity on glass

Table 1 O and Al composition of Alumina films by reactive sputtering

| Sample | O/Al |
|---|------|
| Single Crystal Al ₂ O ₃ | 1.50 |
| Al ₂ O ₃ film (5% O ₂) | 1.52 |
| Al ₂ O ₃ film (10% O ₂) | 1.15 |
| Al ₂ O ₃ film (20% O ₂) | 1.36 |

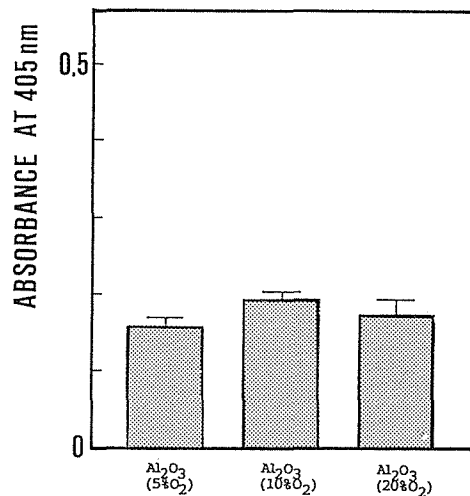


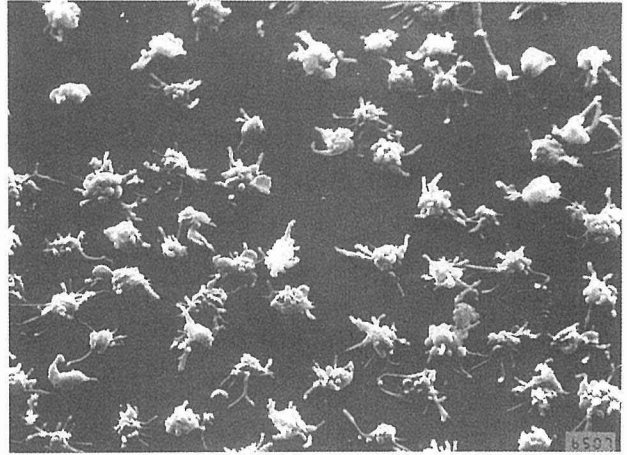
Fig. 5 Comparison of Kallikrein activity on Alumina films by reactive sputtering (Power: 100W, Total Pressure: 0.3 Pa) after 60 minutes incubation

図5に各アルミナ薄膜でのカリクレインの吸光度を示す。結果より、いずれの条件で成膜したアルミナ薄膜においてもカリクレインの吸光度で大きな違いはみられず、およそ等しい値を示していることが分かる。

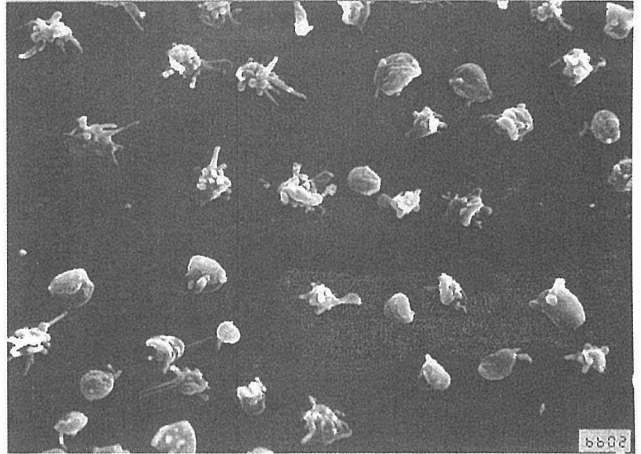
4.3 血小板反応

図6に各アルミナ薄膜と接触させた培養後60分における血小板の様子(SEM, 倍率1000倍)を示す。これより、(a)に示す酸素分圧5%で成膜したアルミナ薄膜では、多くの血小板が偽足が形成されていることが分かる。また、(c)に示す酸素分圧20%で成膜したアルミナ薄膜では、血小板が膜に粘着して張り付いている様子が示されている。これらに比べて、(b)に示す酸素分圧10%で成膜したアルミナ薄膜は、血小板の偽足形成および粘着が少なく最も良好な結果が得られていることが分かる。

(a) Oxygen Partial Pressure 5%



(b) Oxygen Partial Pressure 10%



(c) Oxygen Partial Pressure 20%

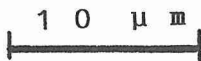
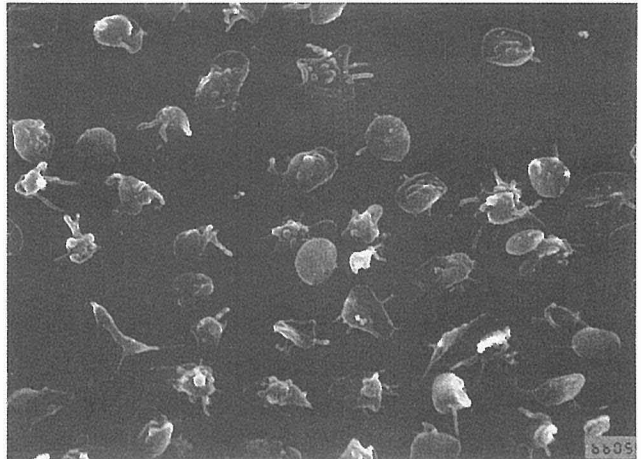


Fig. 6 Comparison of adherent platelets on Almina films by reactive sputtering (Power: 100W, Total Pressure: 0.3Pa) after 60 minutes incubation

5. 考 察

血液は、正常な血管内皮細胞以外の人工物など異物と接触することで、内因凝固系、血小板系、補体系の活性化を引き起こして血栓を形成することが知られている⁸⁻¹⁰⁾。我々は材料の抗血栓性について、内因系凝固因子の活性化および血小板反応に関する In vitro 実験から基礎的な評価を試みた。特に、本研究では反応性スパッタリングで成膜されたアルミナ薄膜の酸素分圧による影響について観察を行った。

内因系凝固因子は、第 X II 因子の活性化によって一連のカスケード反応が進行し、最終的に不溶性であるフィブリン析出によってフィブリン血栓を引き起こす。そのため、カスケード反応の初期にあたる第 X II 因子の活性化は、フィブリン血栓の形成に大きな影響を与える。本研究では、カリクレイン量を比較することで各アルミナ薄膜の内因系凝固因子の活性化に関する評価を行った。その結果、酸素分圧を変化させて成膜した各アルミナ薄膜においてカリクレイン量に大きな差は見られないことが分かった。これより、内因系凝固反応において反応性スパッタリングで成膜されたアルミナ薄膜では、酸素分圧による抗血栓性への影響が少ないことが示唆された。

血小板は、異物表面で偽足を出しながら粘着して多数個の血小板を凝集させ、さらに血小板から放出された顆粒内包物によって、その凝集は一層促進される。そのため、血小板の形態変化は血小板血栓の形成に大きな影響を与える。本研究では、電子顕微鏡による血小板の形態観察から、アルミナ薄膜の血小板反応に関する評価を行った。結果より、血小板反応は薄膜蒸着時の酸素分圧に影響され、酸素分圧 5% および 20% で血小板の偽足形成、粘着が顕著に観察された。これより、酸素分圧 10% で成膜したアルミナ薄膜が最も血小板反応が低いことが示唆された。

6. ま と め

人工臓器の開発において、材料の生体適合性は重要な問題である。特に、抗血栓性は医用材料として最も重要な機能のひとつにあげられる。本研究では、反応性スパッタリングで成膜したアルミナ薄膜の抗血栓性に関する基礎的な評価として、蒸着時の酸素分圧の影響について検討を行った。結果より、アルミナ薄膜は内因系凝固反応において酸素分圧の影響を受けないことが示された。また、血小板反応において酸素分圧による変化がみられ、酸素分圧 10% で最も血小板反応が少ないことが示唆された。

参 考 文 献

- 1) 勇田敏夫：「各種表面処理を行った人工心臓用人工弁の耐久性及び抗血栓性向上に関する研究」(研究課題番号 59480284), 昭和 60 年度科学研究費補助金(一般研究(B)) 研究成果報告書
- 2) A. C. Guyton: Textbook of MEDICAL PHYSIOLOGY, Igaku-shoin/Saunders ed. Philadelphia, 1986, Chapter 8
- 3) 今西幸男, 桜井靖久ほか：「医用材料と生体」, 講談社, 東京, 1982, P 220
- 4) 丹沢 宏：「血栓をつくらない材料」, 化学工業 11 月号, pp 48-53, 1974
- 5) A. D. Haubold: "Blood/Carbon Interactions", Am. Soc. Artif. Intern. Organs, Vol. 6, pp 88-92, 1983
- 6) B. D. Ratner, A. B. Johnston and T. J. Lenk: "Biomaterial surfaces", J. Biomed. Mater. Res.: Appl. Biomat., Vol. 21, No. A 1, pp 59-90, 1987

- 7) 北村元仕, 三輪史朗他: 「臨床検査マニュアル」, 文光堂, 東京, 1988, p 516
- 8) 渥美和彦, 藤正 巖他: 「人工臓器入門」, 講談社, 東京, 1988, 第6章
- 9) 鶴田禎二, 桜井靖久: 「バイオマテリアル サイエンス 第2集」, 南江堂, 東京, 1982, 第5章
- 10) J. C. Barbenel, A. C. Fisher, et. al.: Blood flow in artificial organs and cardiovascular prostheses, Clarendon press, Oxford, 1989, Chapter 11