

非侵襲技術で観察可能な生体由来材料用薄膜マーカ－の作製と評価

薄膜・表面物性研究室 木村 成輝

M176110 Naruki KIMURA

背景と目的

生体組織から細胞成分を除去した脱細胞化組織は生体由来のバイオマテリアルの一種であり、コラーゲンなどの細胞外マトリックス (Extracellular matrices : ECM) で構成されている。脱細胞化組織は、複雑な三次元構造の ECM をそのまま利用できるため、移植用および再生医療用の足場材料、創傷治癒促進材料への応用が期待されている [1,2]。しかし、脱細胞化組織は成分が移植周辺の生体組織と同じであるため、超音波エコーをはじめとする画像診断装置を用いて経過観察することが困難である。そこで、生体組織内に埋植しても、脱細胞化組織の識別が容易となるマーカ－を付与することが求められている。

これまでに、アンバランス型マグネトロンスパッタ (UBMS) 法を用い、製膜時にハニカム構造をもつ金属製マスクを被せることにより、脱細胞化組織表面にチタン (Ti) 薄膜をドット状に製膜した結果、基板がスパッタ時の熱によって変性してしまうことが問題となった。さらに、熱変性を極力抑えて 500 nm の厚さまで Ti 薄膜を製膜した試料をラットに埋植した結果、埋植直後は超音波エコーで観察可能だったが、2 週間飼育後に Ti 薄膜が剥がれてしまった。

本研究では、基板へのプラズマ拡散が少ないバランス型マグネトロンスパッタ (BMS) 法を用い、生体内に移植後も長期間安定して経過観察可能な Ti 製マーカ－の製膜条件を探索した。また、動物に試料を埋植し、エコー観察と並行して肉眼観察を行った。

実験方法

ターゲット材料に Ti、基板にウシ心膜由来脱細胞化組織、製膜方法を BMS、雰囲気ガスに Ar、Ar 圧力を 1.5 Pa を一定条件とし、電力: 200 W、T-S 距離: 93 mm (製膜条件①) および電力: 300 W、T-S 距離: 110 mm (製膜条件②) の 2 つの条件で、穴の直径 3 mm のドット形状のマスクを基板に被せ脱細胞化組織表面に Ti 薄膜を製膜した。このとき製膜条件①ではカプトンテープを、製膜条件②では金属製の固定具を用い、基板とマスクを固定した。製膜後に試料を肉眼観察し、基板の固定方法による脱細胞化組織への熱の影響を調査した。その後、熱の影響が小さかった固定方法を用い、O₂ を 3.0 sccm 加えた反応性スパッタによる TiO₂ の製膜も試みた。さらに、膜厚が 500 nm、2000 nm になるように金属 Ti 薄膜を製膜した試料を Wistar ラット (オス 9 週齢) の背部皮下に埋植した。比較対照として未スパッタ試料も埋植した。埋植直後と埋植 2 週間後に超音波エコーで観察を行い、試料がマーカ－として機能するか評価した。さらに、埋植 2 週間後に試料を取り出し、肉眼観察で薄膜の分解や炎症反応の有無を確認した。

結果と考察

カプトンテープで脱細胞化組織を固定して製膜を行った結果、試料上の端付近で製膜したドット状の薄膜が大きくなり、一部で重なっている様子が確認でき、安定的な製膜が不可能であることが示された (図 1 a)。なお、熱変性を起こさずに製膜できる限界膜厚は、金属 Ti 薄膜の 2000 nm だった。一方、金属製の固定具を用いて製膜した試料は、ドットが大きくなったり、それらが重なる様子は見られなかったことから、カプトンテープの使用よりも金属製の固定具を用いた製膜のほうが安定的な製膜が可能ながわかった (図 1 b)。さらに、金属 Ti 薄膜は 5000 nm まで、

反応性スパッタによる TiO₂ 薄膜も 500 nm では製膜可能だった。金属製の固定具を用いて基板とマスクを固定すると、基板とマスクの間および基板と基板ホルダの間の隙間がなくなる。したがって、マスクと基板の間の隙間から入射するスパッタ粒子が減少し、薄膜同士が重ならない試料を安定的に製膜可能になったと考えられる。さらに、隙間がなくなったことによって、熱伝導性の向上し、脱細胞化組織の温度上昇が抑えられ、長時間の製膜が可能になったと考えられる。

金属製の固定具を用いて製膜した試料をラットに埋植した結果、埋植直後および埋植 2 週間後のどちらにおいても、超音波エコーで Ti 薄膜をハレーションとして観察することが可能だった (図 2b)。さらに膜厚が最も厚い 2000 nm が最も観察が容易だった。これは膜厚が厚いことと、薄膜をドット状に堆積したため、薄膜の形状を容易に見つけだすことが可能だったためだと考えられる。ラットに埋植した試料を取り出した結果、Ti 薄膜は剥がれることなく脱細胞化組織表面に残っていた (図 3b)。UBMS 製膜では、熱変性を極力抑制するために、厚さ 100 nm ごとに複数回製膜して厚さ 500 nm の薄膜を製膜していた。一方、BMS 製膜では、熱変性が抑えられたことによって、膜厚の厚い薄膜も一度で製膜可能となった。一度の製膜で薄膜を脱細胞化組織に堆積することによって、薄膜の密着性が向上し、埋植 2 週間後も薄膜が剥がれなかったと考えられる。また、取り出した試料を肉眼観察した結果、未スパッタ試料とスパッタ試料ともに試料周辺に血管新生や炎症反応は観察されなかった (図 3 a, b)。肉眼観察の結果より、スパッタ処理した試料も、未スパッタ試料と同様に生体為害性を示さないことがわかった。

結論

BMS 法を用いることによって、耐熱性に劣る脱細胞化組織に対して Ti および TiO₂ 薄膜の製膜が可能だった。また、基板とマスクの固定方法が、脱細胞化組織に対する熱変性の抑制および再現性のある安定した製膜を決定する要因であることがわかった。

Ti 薄膜を堆積した試料は、生体為害性を示さず、画像診断装置を用いて長期間安定して経過観察可能なマーカー材料として機能することが示唆された。

参考文献

- [1] 岸田 晶夫, バイオマテリアル-生体材料- **35**(4) pp.242-247 (2017)
- [2] 根岸 淳, 山下 暁立, 船本 誠一, 材料の科学と工学 **54**(1) pp.6-9 (2017)

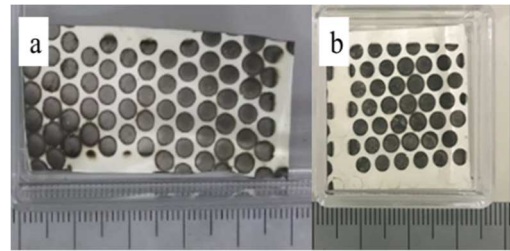


図 1. 各固定方法で製膜した試料の外観 (a: カプトンテープで固定, b: 金属製固定具で固定)

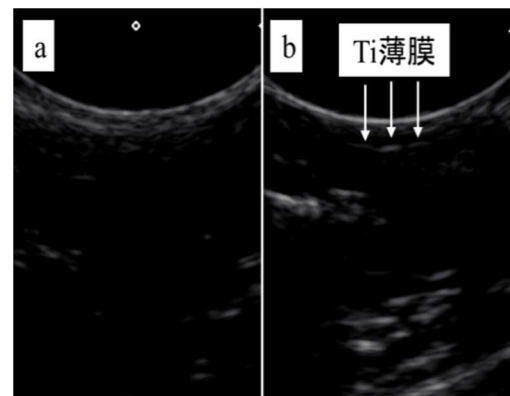


図 2. 埋植 2 週間後に観察した試料のエコー像 (a: 未スパッタ試料, b: 膜厚 2000 nm 試料)

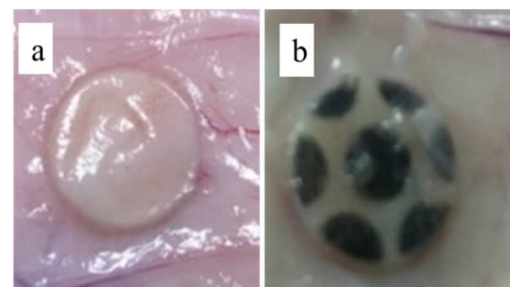


図 3. 埋植 2 週間後に取り出した試料の様子 (a: 未スパッタ試料, b: 膜厚 2000 nm 試料)