

論文要旨

冠動脈疾患の治療に用いられる冠動脈用ステントにはステント留置部位に血栓が形成されてしまう血栓症や新生内膜の過形成による再狭窄の問題がある。これらの問題を解決するべくステント表面に薬剤をコーティングした Drug-eluting stent (DES) が登場したが、1年以上経ってから起こる遅発性血栓症などの問題が新たに起こった。そこで、血栓の形成と炎症を抑える理想的な冠動脈ステントの開発に向け、抗血栓性を持つと言われている fluorinated diamond-like carbon (F-DLC) -coating に着目した。

F-DLC 膜は Diamond like carbon (DLC) にフッ素を添加した膜である。DLC は炭素のダイヤモンド構造である sp^3 結合とグラファイト構造である sp^2 結合を有するアモルファスカーボン膜であり、耐摩耗性、高硬度、化学的不活性などの優れた特性を有している。F-DLC 膜は血小板接着を抑制し、抗血栓性を発揮することがわかっており、医療機器への応用が期待できる。

血管内に留置するバイオマテリアルとして要求される性能には抗血栓性、抗炎症性、細胞増殖性などがある。本研究では、血小板・白血球・血管内皮細胞を用いてこれらの性能を評価した。

1. F-DLC 膜

基質として医療機器に広く用いられる Stainless steel 316L (SUS316L) を使い、高周波プラズマ化学気相成長法 (radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition:

RF-PECVD) を用いてフッ素が組み込まれた F-DLC 膜を蒸着した。中間層として a-SiC:H/a-C:H:Si 膜を蒸着させることで膜の剥離やクラックを防止した。

蒸着した F-DLC 膜を X 線電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy: XPS) とラマン分光法を用いて分析した。膜表面はフッ素を多く含有し、DLC と同じように sp² 結合と sp³ 結合が混合したアモルファスになっていると考えられた。

2. 血小板を用いた抗血栓性の評価

F-DLC コーティングをした SUS disc と F-DLC コーティングをしていない SUS disc に血小板を接触させた。F-DLC 膜では血小板の接着数が減少し、血小板表面抗原である CD62P の発現を抑制した。

CD62P は活性化した血小板に発現し、血栓形成を促進する。CD62P の発現量が減少し、血小板の活性化を抑制したと考えられる。血小板の接着数も減少し、血栓形成を抑制できる可能性が示唆された。また、CD62P は白血球の PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1) に結合して炎症反応のトリガーとなる白血球を活性化させる。CD62P の発現を抑制することで白血球の活性化を抑え炎症反応を抑制しうる。

3. 白血球を用いた抗炎症性の評価

F-DLC 膜と SUS を白血球と接触させると、F-DLC 膜では白血球の接着数を減少させた。白血球の接着は炎症反応の始まりであり、接着を抑制することで炎症反応も抑えられる可能性がある。炎症反応を抑制することで、新生内膜の過形成を抑え、再狭窄を防ぐことが期待される。

F-DLC 膜と SUS に接触させた白血球浮遊液の上清中のサイトカインを測定すると、炎症性サイトカインであり同時に血管新生にも強く関与している IL-8 の産生量が F-DLC 膜では多い傾向が見られた。

4. HUVEC を用いた細胞増殖性の評価

F-DLC 膜と SUS 上で HUVEC の培養を行った。F-DLC コーティングをすると、細胞の接着を抑制したが、接着した細胞は 4 週間増殖し続けることが確認できた。デバイスを血管内に留置する場合、デバイスが細胞に被覆されることで血液に晒されなくなり血栓形成や炎症反応などの異物反応が終息する。F-DLC 膜上に細胞が接着し、増殖することは留置したステントが内膜で被覆され血管と一体化できることを示しており、異物反応が終息していくことが予想される。

F-DLC 膜では HUVEC からの抗炎症性サイトカイン IL-10 の産生が増加する傾向があった。

以上より、F-DLC 膜は抗血栓性、抗炎症性を持ち、F-DLC 膜上で細胞が接着・増殖できることが確認できた。冠動脈ステントだけでなく、血管内に使用するデバイスにコーティングすることで高い生体適合性を有するデバイスの開発が期待できる。

Abstract

The coronary artery stent used for treatment of coronary artery disease is associated with stent thrombosis and restenosis. Stent thrombosis is a thrombotic occlusion and neointimal hyperplasia is the major cause of restenosis at the site of stent placement. In order to prevent these problems, a drug-eluting stent (DES) that is coated with a drug on the surface of the stent has been developed, but new problems, such as very late stent thrombosis occurring more than one year later, arose. Therefore, we focused on fluorinated diamond-like carbon (F-DLC) coatings, which is known to have antithrombotic properties, as a better coronary artery stent with the ability to prevent thrombotic and inflammatory events.

F-DLC films has fluorine added to diamond-like carbon (DLC) films. DLC is an amorphous carbon film having sp^3 bonds with a diamond-like structure of carbon and sp^2

bonds with a graphite-like structure. DLC has superior abrasion resistance, high hardness, and chemical inertness. It is known that F-DLC films inhibit platelet adhesion, and this can be applicable to medical devices.

A biomaterial that is placed in a blood vessel requires anti-thrombotic, anti-inflammatory, and cell proliferative properties. In this study, these functions were evaluated using platelets, leukocytes and vascular endothelial cells.

1. F-DLC films

Using radio frequency plasma-enhanced chemical vapor deposition (RF-PECVD), fluorine-incorporated diamond-like carbon (F-DLC) films were deposited on a stainless steel (SUS) 316L alloy, which is widely used as a substrate for medical equipment. a-SiC:H/a-C:H:Si film was deposited as an intermediate layer to prevent peeling and cracking.

F-DLC films were analyzed by XPS and Raman spectroscopy. The surface of the film contained a large amount of fluorine and had sp^2 bonds and sp^3 bonds like DLC.

2. Evaluation of antithrombogenicity using platelets

Platelets were exposed to F-DLC-coated and -uncoated SUS discs. Compared to F-DLC-uncoated SUS discs, the number of platelets adherent and the CD62P expression in reaction to F-DLC-coated SUS was significantly lower. CD62P is the platelet activation marker most closely associated with increased thrombotic risk and promotion of thrombus formation. In addition, CD62P binds to leukocyte P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) and activates the leukocytes that trigger the inflammatory response. It may imply inhibition of leukocyte accumulation, rolling, adhesion, and transmigration through interaction with activated platelets by the F-DLC-coating, consequently preventing thrombosis and inflammation.

3. Evaluation of anti-inflammatory features using white blood cells

When granulocytes were exposed to F-DLC-coated and -uncoated SUS discs, the number of granulocytes adherent to the surface of disc coated with F-DLC was significantly

decreased compared to F-DLC-uncoated SUS discs. Adhesion of leukocytes is the beginning of the inflammatory reaction, and anti-inflammatory features of F-DLC-coated materials are thus expected to suppress neointimal hyperplasia and prevent restenosis.

Leukocytes (lymphocytes, monocytes, and granulocytes) were exposed to FDLC-coated and -uncoated SUS discs, and the concentration levels of various cytokines in their supernatants were measured. The level of interleukin (IL)-8, a cytokine with potent neutrophil-activating and angiogenic activities, was found to be significantly increased in the supernatant from leukocytes exposed to FDLC-coated discs compared to those exposed to uncoated SUS discs. A higher level of IL-8 is thought to enhance inflammation, while promoting early coverage of the stent surface after stent placement.

4. Evaluation of cell proliferation using HUVECs

HUVECs (human umbilical vein endothelial cells) were seeded on F-DLC-coated and -uncoated SUS discs. F-DLC-coated SUS discs inhibited cell adhesion, although adherent cells continued to grow for four weeks. The supernatants of HUVECs cultured on F-

DLC-coated and -uncoated SUS discs were collected, and the cytokine levels were measured. The levels of IL-10, an anti-inflammatory cytokine, were significantly elevated in the supernatant from HUVECs cultured on F-DLC-coated SUS discs compared to those cultured on F-DLC-uncoated ones.

The present study revealed that F-DLC had anti-thrombotic, anti-inflammatory properties, and affected the ability of cells to proliferate on the F-DLC-coated SUS discs. Development of devices, not only coronary artery stents but also intravascular devices, with high biocompatibility can be expected with F-DLC coatings.

略語一覽

ACD	acid-citrate-dextrose
BMS	Yare metal stent
BRS	bioresorbable scaffold
CABG	coronary artery bypass grafting
CVD	chemical vapor deposition
DAPT	dual anti-platelet therapy
DES	drug eluting stent
DLC	diamond like carbon
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
F-DLC	fluorinated diamond like carbon
FITC	fluorescein isothiocyanate
GIC	graphite intercalation compounds
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
LFA-1	lymphocyte functional antigen-1, CD11a/CD18
LST	late stent thrombosis
PAF	platelet- activating factor
PCI	percutaneous coronary intervention
PFA	paraformaldehyde
PPP	platelet-poor plasma

PRP	platelet-rich plasma
PVD	physical vapor deposition
RF-PECVD	radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition
ST	stent thrombosis
SUS	stainless steel
TF	tissue factor
TMS	tetramethylsilane
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late antigen-4
vWF	von Willebrand factor
XPS	X-ray photoelectron spectroscopy

1章 序章

1-1 ステントとは

ステントとは体内の血管や気管、尿管、食道などの管状の組織を内部から広げるために用いられる医療機器であり、網目状の筒でできていることが多い。素材は主に金属が用いられる。冠動脈疾患に使用する血管内留置型デバイスとして冠動脈ステントがある。

コレステロールが血管壁に付着して炎症が起きたり、毒性物質が増えて損傷したりして、冠動脈内壁を覆っている内皮細胞が傷つくとマクロファージがコレステロールを取り込みながらアテローム（粥状硬化層）を形成し、さらに血小板が凝集して内膜が厚くなる。これにより血管が細くなり血流が滞ったり、閉塞したりする。これが冠動脈疾患である。冠動脈疾患には狭心症と心筋梗塞の二つがあり、治療法には内科的治療と外科的治療がある。内科的治療には薬物療法と経皮的冠動脈インターベンション（percutaneous coronary intervention: PCI）があり、外科的治療には冠動脈バイパス手術（coronary artery bypass grafting: CABG）がある（補足資料 P.2）。PCI は手首や足の付け根の動脈から細いカテーテルを挿入して治療するため、開胸手術が必要な CABG と比べて体への侵襲が少ないことが利点である。この PCI で使用する医療機器にバルーンや冠動脈ステントがある。小さなバルーンに取り付けた冠動脈ステントを狭窄し

た血管に挿入し、バルーンで拡張したのちバルーンのみを抜去する。ステントを留置することで血管を拡張、血流を確保することができる (Fig. 1、Fig. 2)。

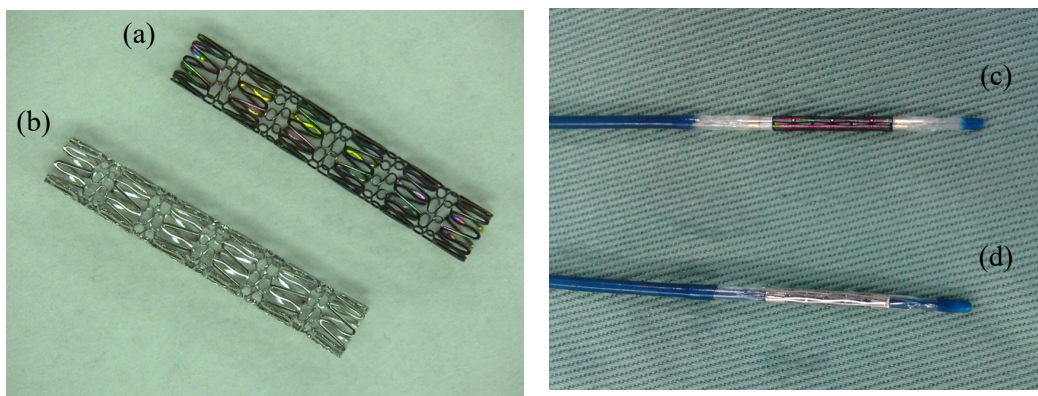


Fig. 1 (a) Fluorinated diamond like carbon (F-DLC) -coated stent, (b) F-DLC-uncoated stent, (c) balloon mounted F-DLC-coated stent and (d) balloon mounted F-DLC-uncoated stent.

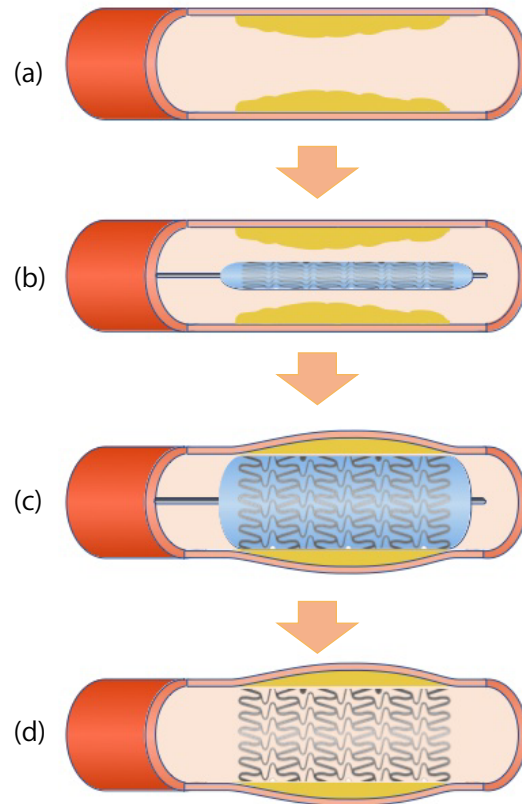


Fig. 2 Stages of stent placement. (a)stenosis, (b)stent with balloon inserted, (c)balloon inflated to expand stent and (d)balloon pulled out and stent placed to keep lumen open.

ステントを用いず、バルーンで血管を拡げたのちバルーンを抜去するバルーン拡張による PCI では動脈壁が収縮するエラスティックリコイルや外弾性板が縮むネガティブリモデリング、平滑筋細胞の増殖による新生内膜過形成が起こり、40%程度再狭窄してしまうことが問題となっていた(1-3)。そこで開発されたものが金属ステント (bare metal stent: BMS) である。これによりエラスティックリコイルやネガティブリモデリ

ングはある程度解決されたが、20%前後の患者で依然として再狭窄が起こった(1, 2, 4)。この再狭窄の他にも、1ヶ月までのステント血栓症 (stent thrombosis: ST) が問題となった。ステント血栓症とは、ステント表面やステントを留置する際に生じた障害部位に血小板やフィブリンが接着・蓄積し、血栓を形成することで起こる。障害部位が治癒し、ステントが新生内膜に被覆されてステント表面が血液に晒されなくなると血栓の形成は抑えられる。この新生内膜にステントが被覆されるには1-2ヶ月かかり、これまでの間にステント血栓症が起こることが多い。2剤の抗血小板薬療法 (dual anti-platelet therapy: DAPT) を行うことで血栓の形成を防ぎ、ステント血栓症の発生率は許容可能な範囲にまで低下した。しかしながら、抗血小板薬を使用することは出血の危険性が少なからず伴い、服薬期間をできるだけ短くできることが望ましい。

BMS で問題となっていたステント内再狭窄を解決するため、薬剤溶出ステント (drug eluting stent: DES) が開発された。ステント内再狭窄はステント留置部位の障害やステントという異物に対する生体の異物反応により白血球が活性化し炎症が持続することで、平滑筋細胞が過増殖し血管が再び狭くなり引き起こされる。DES は金属ステント表面に薬剤が染み込んだポリマーをコーティングしており、ポリマーにより薬剤溶出量や期間をコントロールすることができる。これにより均一な量の薬剤が長期間放出される構造になっている。薬剤には炎症を抑える免疫抑制剤や細胞増殖を抑える抗がん剤などが用いられ、細胞の過増殖を抑制し再狭窄を予防する。DES を使用することにより再狭窄は劇的に減少し、数%にまで抑えられた(5, 6)。

しかし、DES により再狭窄は減少したものの、新たに遅発性血栓症 (late stent thrombosis: LST) が問題となった。LST とはステント留置後1年以上たってから起こるステント血栓症のことである。DES は抗がん剤や免疫抑制剤をリリースすることで平滑筋

細胞の増殖を抑えている一方、新生内膜による再内皮化が遅れ血管修復を阻害していると言われている。その結果、ステントストラットは長期間新生内膜に被覆されず露出したままになる。この露出したステント表面に血栓が形成され、ステント血栓症が引き起こされると考えられている(7)。第1世代のDESにおいてLSTが問題となり(8, 9)、ポリマーや薬剤などを変えた第2世代DESが登場した。DES表面に使用する薬剤を変更し、よりステントを薄くすることによりLSTの発生率は下がったが(5)、LSTの発生率を許容可能な範囲まで抑制するためには2剤併用抗血小板療法の長期的な使用が必要とされている(8, 10)。また、薬剤によっては血管機能が慢性的に障害されるとの報告もあり(11, 12)、検討すべき課題となっている。

現在、生体吸収性スキャフォールド (bioresorbable scaffold: BRS) を使用した生体吸収性ステントが開発された。これはステント留置後に数年で溶けてなくなるため、数年後に再び狭窄しても再度留置することができる。また内皮内皮機能を障害しにくいことが期待されている。しかしながら、金属に比べて強度が低いため、ストラットが厚くなり血栓症をきたしやすい可能性も示唆されており、更なる改良が必要とされている(13)。

1-2 バイオマテリアルと生体適合性 (biocompatibility)

バイオマテリアルとは、医療器具として主に生体内に移植することを目的として作られた材料のことで、異物反応を抑制できるような優れた生体適合性を有することが

求められる。他にも毒性がないこと、生体内で劣化や分解が起こらないような安定性が必要とされる。材料としてはステントや人工関節に使われるような金属、縫合糸などに使われる合成高分子などがある。本研究のコーティング対象として考えている冠動脈ステントでは一般的にステンレス鋼（stainless steel: SUS）や Co-Cr 合金が使われている。

バイオマテリアルを生体内に留置すると血液や細胞と接触するため、生体の持つ異物反応が問題となる。異物と認識されたバイオマテリアルは生体の自己防衛反応により炎症反応や血栓形成など様々な生体反応が起こる。バイオマテリアルが生体内に留置されると、まずバイオマテリアル表面へのタンパクや細胞の吸着・接着が起こり、続いて炎症反応や免疫反応が始まり、そして修復・再生が起こる(14)。

バイオマテリアルに必要とされる生体適合性の定義は明確にはなっていないが、毒性のないこと、非免疫原性であること、血栓を形成しないこと、発ガン性のないこと、刺激性のないことがあげられる(14)。バイオマテリアルとして生体に影響があると考えられている特性には結晶性、疎水性・親水性バランス、電子特性など様々なものがあり、これらの特性を変えることで生体適合性を向上させることができる。そのため材料の表面特性を変えることは極めて有効な手段であり、表面コーティングは材料の化学的及び物理的性質を向上させる一つの方法である。

1-3 バイオマテリアルとしてのステント

バイオマテリアルのひとつである冠動脈ステントでは、内膜過形成による再狭窄、血液凝固による血栓形成が問題となる。ステント血栓症は、ステント材料上またはステントにより傷害された部位で血小板やフィブリンが蓄積することによって引き起こされる。また、ステント内再狭窄は異物反応により白血球が活性化し、血管内皮細胞に浸潤していき炎症反応が起こり、細胞が過増殖することにより引き起こされる。

これらの問題を解決するため、ステント材料は血栓形成と白血球の活性化を抑制する必要がある。また、血液に曝露される期間を短くすることでこれらの異物反応の長期化を防ぐことができるため、ステント表面が細胞に速やかに被覆されることが求められる。理想的なステントは、抗血栓性だけでなく抗炎症性を持ち、平滑筋過増殖による新生内膜過形成を防ぐが、血管内皮細胞の再生による再内皮化を促進する必要がある。

1-4 F-DLC について

フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン（fluorinated diamond like carbon: F-DLC）はダイヤモンドライクカーボン（diamond like carbon: DLC）にフッ素を添加した膜であり、成膜する際にフッ素を含んだガスを用いることでフッ素を DLC 膜に含有させている。

炭素とフッ素の化合物としてフッ化黒鉛がある。高温下で合成されポリマーを形成し、原子配列は規則的である。フッ化黒鉛は潤滑向上剤や電池に応用されている。DLCも同様にフッ素と炭素からなるが、フッ化黒鉛と異なり微細構造にも成膜できる。DLCは炭素のダイヤモンド構造である sp^3 結合とグラファイト構造である sp^2 結合を有するアモルファスカーボン膜である (Fig. 3)。DLCは、耐摩耗性、高硬度、化学的不活性、耐食性、および生体適合性などの優れた特性を有し(15, 16)、コーティング材料として注目されている。その性質を利用して整形外科や歯科領域などでバイオマテリアルへのコーティングとして使用されている(16, 17)。成膜方法には物理蒸着法 (physical vapor deposition: PVD) と化学蒸着法 (chemical vapor deposition: CVD) がある。CVDのうちプラズマCVD法は原料にガスを用いるため複雑形状部品への成膜に適しており、均一な皮膜を形成することができる(18)。高周波により原料ガスをプラズマ状態にするプラズマCVD法をRF-PECVD法 (radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition) という。

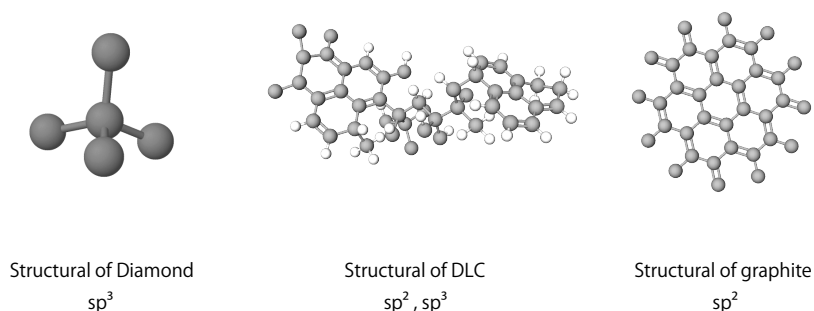


Fig. 3 Structure of Diamond like carbon (DLC). Diamond consists of sp^3 bonds and graphite consists of sp^2 bonds. Diamond like carbon has sp^2 bonds and sp^3 bonds.

DLC にフッ素を添加した F-DLC 膜は血小板接着を抑制し、抗血栓性を発揮することが明らかになっている(19)。また、F-DLC 膜は内皮細胞増殖を阻害することなく、血漿タンパク質の吸着を減少させることがわかっており(20, 21)、F-DLC コーティングされた生体材料は、生体内で毒性がないことも確認されている(22)。

ステントのように拡張し、心臓の拍動とともに伸縮するマテリアルではコーティングの剥がれやクラックが問題となる。DLC 膜は内部残留応力が発生し、密着性が低いことが一つの課題となっている。この内部残留応力を低減することでコーティングの密着性を向上し、クラックを予防することができる。DLC 膜中の未結合水素による体積膨張による歪みや炭素の強固な 3 次元ネットワークの形成による応力の蓄積により内部残留応力が発生するという説もあり(23)、DLC 膜の残留内部応力を低減し密着性を上げることが必要である。ケイ素を含んだ DLC (a-C:H:Si) と水素化アモルファルシリコンカーバイド (a-SiC:H) の中間層を作ることで、DLC 膜の剥離やクラックを改善することが報告されており(24, 25)、ステントに a-C:H:Si/a-SiC:H を蒸着したのち、F-DLC 膜を蒸着することで接着不良やクラックを防止できることが明らかとなった(26) (Fig. 1)。また、F-DLC 膜の方が DLC 膜より柔軟性があり、ストレッチ素材にコーティングしてもひび割れにくいことがわかっている(27)。一方で生体内に長期に留置するにあたり、膜が長期にわたり安定であることが必要となる。加速劣化試験を行い F-DLC 膜の安定性が確認されている(28)。しかしながら、F-DLC 膜がステント再狭窄の重要なファクターである炎症に及ぼす影響については未だ明らかになっていない。

1-5 研究の目的

薬剤溶出ステントの登場により再狭窄率は低下したものの、長期にわたる安全性や有効性は明らかになっていない。また、薬剤の長期的な服用が必要であり、血管機能障害を起こすなど問題は依然として残されている。そこで、薬剤を使うことなく生体適合性を向上させることのできるコーティング技術は非常に有用である。F-DLC 膜は抗血栓性を発揮することがわかっており(19)、バイオマテリアルへの応用が期待できる。ステントは留置時に拡張し、その後も心臓の拍動に伴い伸縮を繰り返す。これに耐えうる F-DLC コーティングが可能になり(26)、F-DLC 膜の生体適合性を評価することが求められている。

本研究では、F-DLC コーティングのステントへの応用を視野に入れた生体適合性を評価することを目的としている。理想的なステントは、血栓形成を防ぐだけでなく、炎症を抑制し平滑筋過増殖による新生内膜過形成を防ぐが、血管内皮細胞の再生による再内皮化を促進する必要がある。F-DLC 膜の抗血栓性については研究されているが、抗炎症性や細胞接着性など多角的に評価した研究は未だない。そこで、生体適合性の評価として、血小板の接着および活性化を評価するだけでなく、炎症に関係する白血球の接着および産生されるサイトカインも評価した。また、F-DLC 膜上での内皮細胞の接着・増殖、産生されるサイトカインについても評価した。

第 2 章では、F-DLC 膜の表面を X 線電子分光法 (X-ray photoelectron spectroscopy: XPS) とラマン分光法を用いて測定した。XPS による測定によりフッ素の含有量や結合状態を評価した。ラマン分光法では成膜された膜の結晶構造を確認した。

第3章では、血小板、白血球およびヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells: HUVEC）を用いた評価実験を試みた。血小板や白血球の接着数および血小板表面抗原である CD62P の活性を測定した。また、白血球や HUVEC から産生されるサイトカインを測定した。HUVEC を F-DLC 膜上で培養し、接着・増殖するかも検討した。

第4章では、第3章で行なった評価実験の結果を述べ、F-DLC 膜の抗血栓性や炎症性、生体適合性について考察した。

2章 F-DLC 膜の表面分析

2-1 緒言

フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン (F-DLC) はダイヤモンドライクカーボン (DLC) にフッ素を添加した膜である。DLC は sp^3 結合と sp^2 結合を有するアモルファスカーボン膜であり、耐摩耗性、高硬度、化学的不活性、耐食性、および生体適合性などの優れた特性を有することで知られている(15, 16)。その性質を利用して整形外科や歯科領域などではすでにバイオマテリアルへのコーティングとして利用されている(16, 17)。DLC にフッ素を添加すると抗血栓性が向上し、フッ素の含有量が増加するとともに水との接触角が増加し、より疎水性になることがわかっている(19)。この疎水性表面であることが F-DLC 膜の抗血栓性を向上させていると考えられているが、詳細なメカニズムについては明らかになっていない。

DLC 膜の成膜方法にはいくつかあり、ステントなどの複雑形状に均一に成膜するには、原料にガスを使用するプラズマ CVD 法が適している (補足資料 P.6) (18)。ステントのように拡張し心臓の拍動とともに伸縮するマテリアルではコーティングの剥がれやクラックが問題となる。中間層として a-C:H:Si/a-SiC:H を蒸着したのち、F-DLC 膜を蒸着することで接着不良やクラックを防止できることが先行研究でわかっており(26)、ステントへの F-DLC 膜のコーティングが可能となった (補足資料 P.7)。

生体内に留置するにあたり、毒性がないこと、長期にわたり安定なことが必要となる。F-DLC コーティングされた生体材料は生体内で毒性がないことが確認されており(22)、また加速劣化試験により F-DLC 膜の安定性も確認されている(28)。しかしながら、ステントが接触する血液や血管内皮細胞との生体適合性に関する多角的な評価はまだ行われていない。また、中間層を用いた F-DLC 膜表面に関しては、接触角から算出した表面エネルギーの以外の分析は行われていないため(26)、膜の表面分析を行う必要がある。DLC 膜の表面分析にはいくつかの方法があるが、その中でも元素組成や化学結合状態を知ることができる XPS や結晶構造を解析できるラマン分光法はよく用いられる手法である(29, 30)。

F-DLC コーティングステントの実用化に向け、まず中間層を用いた成膜条件で F-DLC 膜を成膜し(26)、膜の表面分析を行い評価した。

2-2 F-DLC 膜のコーティング

24-well plate の底面と同じ大きさである $\phi 15.3$ mm の円形 SUS316L ステンレス鋼基材 (SUS disc) を用意した。厚さは 0.8 mm であった。SUS disc は表面を電解研磨し滑らかにした。

まず、第 1 中間層である a-SiC:H 膜を SUS disc 表面に RF-PECVD 装置 (radio frequency plasma enhanced chemical vapor deposition、オンワード技研株式会社) を用いて蒸着させ、次に第 2 中間層である a-C:H:Si 膜を蒸着させた。a-SiC:H 膜は tetramethylsilane

(TMS、信越化学工業株式会社) を 16 sccm の流量で 10 分間、-2.0 kV のバイアス電圧下で蒸着させ、a-C:H:Si 膜は TMS と C₂H₂ の混合ガスをそれぞれ 4 sccm、65 sccm の流量で 10 分間、-2.0 kV のバイアス電圧下で蒸着させた。その後、acetylene ガス (C₂H₂、高圧ガス工業株式会社) と perfluoropropane ガス(C₃F₈、岩谷産業株式会社)の混合ガスを使い蒸着させた。F-DLC 膜の成膜には C₃F₈、C₂F₆、CF₄ のいずれも使用可能だが、すでにステントへの成膜条件として C₃F₈ を使用して確立されおり(26)、ステントへの成膜を目的とし、その膜の評価を行う本研究においても同様に C₃F₈ を使用した。acetylene ガスと perfluoropropane ガスをそれぞれ 10 sccm、100 sccm のガス流量で導入し、-1.0 kV のバイアス電圧で 10 分間蒸着した。a-C:H:F 膜、a-C:H:Si 膜、a-SiC:H 膜の膜厚をカロテスト (Calotest, CSM Instruments) により測定したところ、それぞれ約 200 nm、約 100 nm、約 100 nm であった (Table 1, Fig. 4, Fig. 5) (26)。

Table 1 Film forming conditions.

	a-SiC:H film	a-C:H:Si film	a-C:H:F film
thickness	100 nm	100 nm	200 nm
Gas[Flow rate]	TMS[16 sccm]	C ₂ H ₂ [65 sccm] TMS[4.0 sccm]	C ₂ H ₂ [10.0 sccm] C ₃ F ₈ [100.0 sccm]
Bias voltage	-2.0 kV	-2.0 kV	-1.0 kV
time	600 s	600 s	600 s

The F-DLC film was deposited on SUS316L stainless steel disc substrates from a mixture of acetylene (C₂H₂) and perfluoropropane (C₃F₈) using RF-PECVD equipment. To avoid cracking and peeling the F-DLC film, a-C:H:Si/a-SiC:H interlayer was deposited.

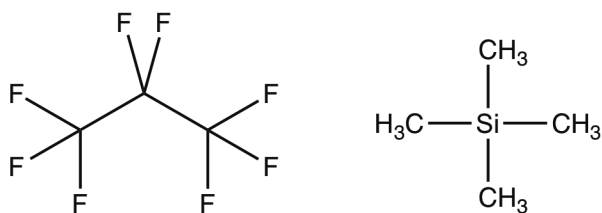


Fig. 4 Structural formula of perfluoropropane (left) and tetramethylsilane (right). The F-DLC film was deposited from a mixture of acetylene and perfluoropropane. The interlayer to prevent cracking and peeling was deposited on SUS316L from tetramethylsilane.

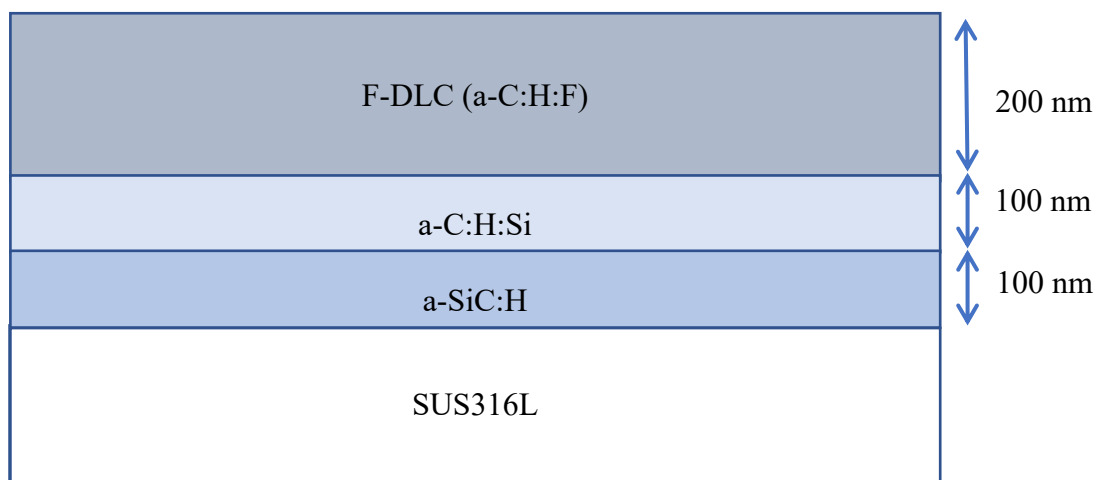


Fig. 5 Diagram of the F-DLC film. The F-DLC film was deposited on SUS316L stainless steel. a-SiC:H and a-C:H:Si coating were first deposited on SUS316L substrates to avoid peeling and cracking.

2-3 F-DLC 膜の表面分析

2-3-1 XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy)

SUS disc にコーティングした 3 層のうち、最表面にある F-DLC 層の元素組成と結合状態を X 線光電子分光装置 (XPS、K-Alpha、Thermo Fisher Scientific) を用いて分析した。ワイドスキャン、ナロースキャンともに一箇所あたりのスキャン回数は 5 回とした。ナロースキャンでは、C、F、O の 3 元素を測定した。X 線スポット径は 200 μm で行った。測定箇所はプレート中央、下部、右の 3 箇所を行った。

F-DLC 膜のワイドスキャンスペクトルを測定し、C1s、F1s、O1s スペクトルのピーク面積と相対感度係数から膜表面の各元素の含有率を算出した。また、C1s スペクトルより、ピーク分離し結合状態を調べた。

2-3-2 ラマン分光分析

F-DLC 膜をコーティングしたサンプルを顕微レーザーラマン分光分析装置 (LabRM HR-800、堀場製作所/Jobin Yvon) を用いて 3 箇所測定した (Fig. 6)。測定条件を下記に示す。

レーザー波長：514.5 nm

レーザーパワー：2 mW

レーザー照射範囲：約 30 μm 四方（高速走査測定）

露光時間×積算回数：30 秒 × 8 回

回折格子：600 gr/mm

共焦点ホール径：100 μm

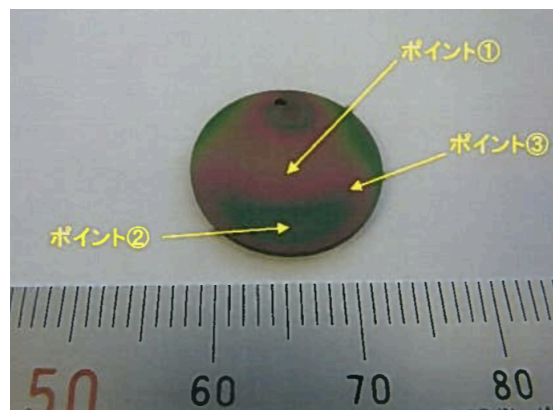


Fig. 6 Measurement points of Raman spectroscopy. Three points on the F-DLC-coated SUS disc were measured.

2-4 結果

2-4-1 XPS による膜表面分析

F-DLC 膜表面のワイドスキンスペクトルと C1s スペクトル、F1s スペクトル、O1s スペクトルを Fig. 7、Fig. 8 に示す。ワイドスキンスペクトルより、C、F、O の元素の存在が認められた (Fig. 7)。F は約 30% と高い割合で含まれていた。また、O も含まれており、酸化されていることもわかった。C1s、F1s、O1s スペクトルより算出した各元素の存在比率 (Atomic %) を Table 2 に示す。C1s スペクトルより C-C 結合 (284.0-286.0 eV)、C-CF 結合 (286.0-287.7 eV)、C-F 結合 (287.0-293.4 eV)、C-F₂ 結合 (291.6-292.4 eV) を持つことがわかった(31-33)。C-F₃ 結合 (292.4-293.4 eV) は検出されなかった。C1s スペクトルより算出した各化学結合の構成を Table 3 に示す。測定した 3 箇所のうち、1 箇所に関しては強度が小さくノイズが大きかったため、C1s スペクトルから各結合の構成を算出できなかった。なお、820 前後のピークは K 殻の空孔に L 殻から遷移したオーজে電子によるオージェピークである。

スペクトルの積分強度より F/C が求められる(34)。

$$F/C = (3I_{CF3} + 2I_{CF2} + I_{CF}) / I_{C1s}$$

ピーク分離した C1s スペクトルの各結合の積分強度から上記の式を用いて算出したフッ素と炭素の比 F/C と C1s スペクトル、F1s スペクトルの積分強度から算出した F/C を Table 4 に示す。二つの方法で算出した F/C の値には差があり、C1s スペクトルの各結合から算出した F/C の値の方が小さかった。

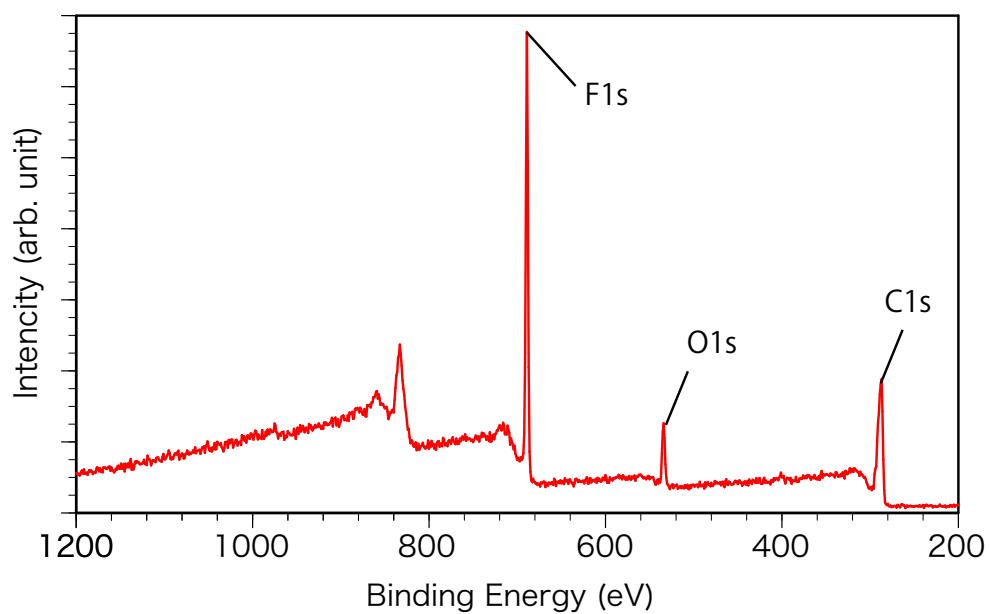


Fig. 7 XPS wide-scan spectrum of the F-DLC-coated SUS316L. The spectrum showed F1s, O1s and C1s peaks. The surface of F-DLC film consisted of C, F and O.

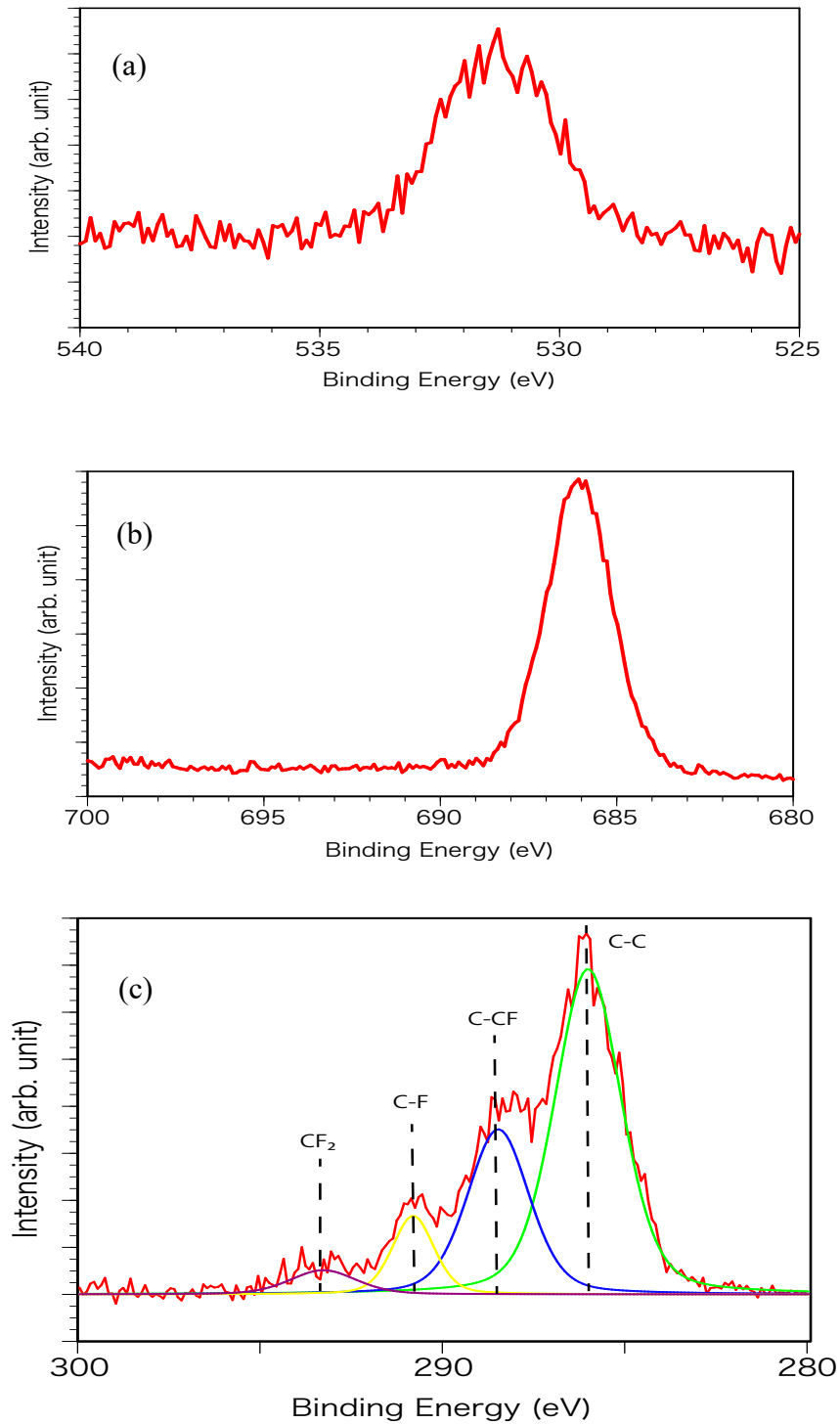


Fig. 8 XPS spectra of F-DLC-coated SUS316L. (a) O1s spectrum and (b) F1s spectrum of F-DLC coated SUS 316L. (c) C1s spectrum of F-DLC-coated SUS316L had four main peaks which showed C-C, C-CF, C-F and C-F₂ bonds, respectively.

Table 2 Atomic Concentration (Atomic Percent) of the F-DLC film. The element concentrations of the F-DLC film were about 60 at.% carbon, 30 at.% fluorine and 10 at.% oxygen.

sample	Oxygen	Fluorine	Carbon
center	7.87	27.41	64.72
under	8.25	32.48	59.27
left	11.72	29.14	59.13

Table 3 XPS Chemical Composition (Atomic Percent) of the F-DLC film. The F-DLC film had sufficient C-F bonds on its surface.

sample	C-C	C-CF	C-F	C-F ₂
center	63.26	24.37	10.06	2.32
under	59.44	25.72	9.84	5.00

Table 4 The Comparison of Fluorine to Carbon Ratios (F/C).

sample	F/C (fitting C1s signal)	F/C (integrated intensities)
center	0.15	0.42
under	0.20	0.55

F/C (fitting C1s signal) obtained by the intensities of the carbon components. F/C (integrated intensities) obtained by the integrated intensities of C1s and F1s signals. F/C (fitting C1s signal) were lower than F/C (integrated intensities).

2-4-2 ラマン分光法による膜表面分析

ラマン分光分析結果を Fig. 9 に示す。スペクトルより DLC に特徴的な G バンド ($1,550\text{ cm}^{-1}$) と D バンド ($1,360\text{ cm}^{-1}$) がどの測定箇所においてもそれぞれ観測された。

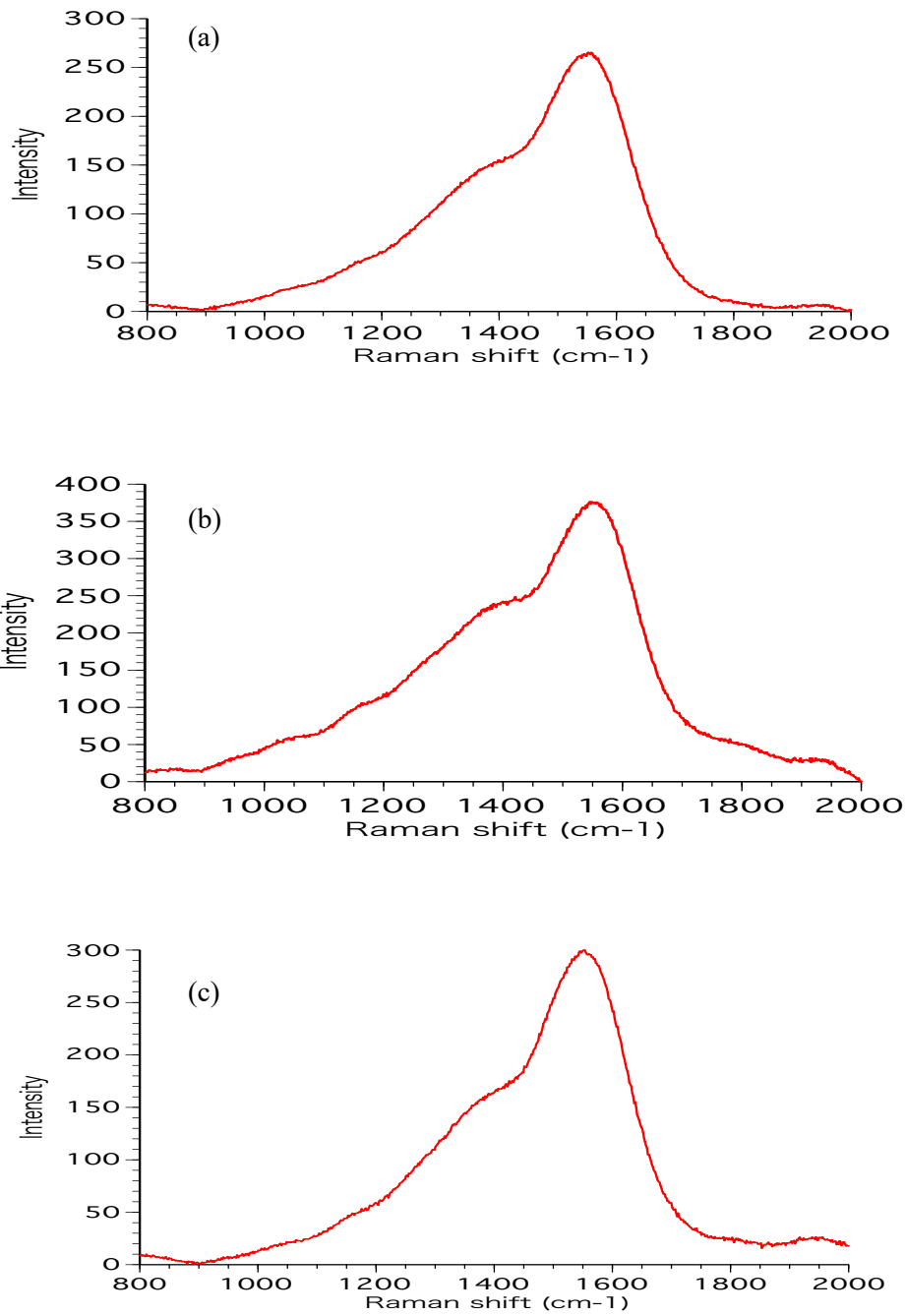


Fig. 9 Raman spectra of F-DLC coated SUS316L. (a), (b) and (c) spectrum were obtained at three different spots on the substrate shown Fig. 6. G band and D band were observed in all spectra.

2-5 考察

ラマン分光法は炭素構造の測定に優れており、アモルファスでも測定できることから、DLC 膜の成膜評価に広く用いられている。一般に DLC 膜は G (graphite) バンドと D (disorder) バンドを有する特徴的なラマンピークが観測される。G バンドはグラファイト構造の sp^2 結合に由来し、D バンドは sp^3 結合の増加に関係するグラファイト構造の乱れに起因すると考えられている。今回の F-DLC 膜においても G ピークと D ピークが検出されたことより、DLC と同じように sp^2 結合と sp^3 結合からなるアモルファスを形成していると考えられる。

XPS の C1s スペクトルより C-F、C-F₂ 結合を持つことがわかり (Fig. 8)、F-DLC 膜中でフッ素が炭素に結合して存在していることがわかった。また、C1s スペクトルと F1s スペクトル、O1s スペクトルより約 30% と高い割合でフッ素が含まれることが明らかとなった (Table 2)。フッ素の含有率を 30% 前後にすると膜の追従性、密着性が向上し、かつ疎水性が向上し抗血栓性を発揮することが先行研究によりわかっている(19, 20, 22, 27, 35)。成膜に使用したガスには含まれない酸素が膜中に存在しており、これは空気中の酸素により酸化したものと予想される(28)。本研究に用いた F-DLC 膜も疎水性を持つと考えられ、抗血栓性を有することが期待できる。

C1s スペクトルと F1s スペクトルの積算強度から算出したフッ素と炭素の比 F/C (integrated intensities) と C1s スペクトルからピーク分離したそれぞれの結合スペクトルの積算強度から算出した F/C (fitting C1s signal) を比較すると、F/C の値に差があること

がわかった (Table 4)。F1s スペクトルの F の量は膜中に存在する F の量に関係し、C1s スペクトルの各結合スペクトルから算出した F の量は C に結合している F、つまり C-F 結合している F の量に関係する。F/C の値を見ると、C1s スペクトルと F1s スペクトルの積算強度から算出した値の方が大きい。つまり、C-F 結合をしている F の他に C-F 結合を作らない F が存在することを示唆している。

C に結合していない F はグラファイトの層状構造の層の間にトラップされている可能性がある(30)。層状構造を持つ物質などの間に分子やイオンなどが入り込むことをインターカレーションといい、入り込む分子やイオンのことをインターカレートという。グラファイトにおけるインターカレーションは多くあり、インターカレートにはフッ化物、塩化物、金属原子などがある。グラファイトの平面構造間の結合は弱いファンデルワールス力が働いており、それよりも強い力で結合しうる原子・分子が近づくと、層間に入り込み、層間化合物をつくる。グラファイトの層間にさまざまな分子や原子がインターカレーションして形成された化合物はグラファイト層間化合物

(graphite intercalation compound: GIC、Fig. 10) と呼ばれている。電荷移動による結合が多く、インターカレートの電子がグラファイトの π 結合に供給される(36)。GIC のうち、フッ素がインターカレーションしている化合物には高温下で合成される共有結合性のフッ化黒鉛 (CF)_n, (C₂F)_n と 100°C 以下の低温において合成されるイオン結合性のフッ素-グラファイト層間化合物 C_xF がある(37)。XPS で原子の結合状態を見ると、共有結合性であるフッ化黒鉛では CF に大きなピークが現れ、イオン結合性のフッ素-グラファイト層間化合物が増えるにつれ、CF のピークは小さくなり CC のピークが大きくなる(37-39)。今回の F-DLC 膜は低温化で合成されており、また XPS で C-F に大きな

ピークが観察されていないことから、Cに結合していないFによりイオン結合性のフッ素-グラファイト層間化合物が一部形成されていると予想される。

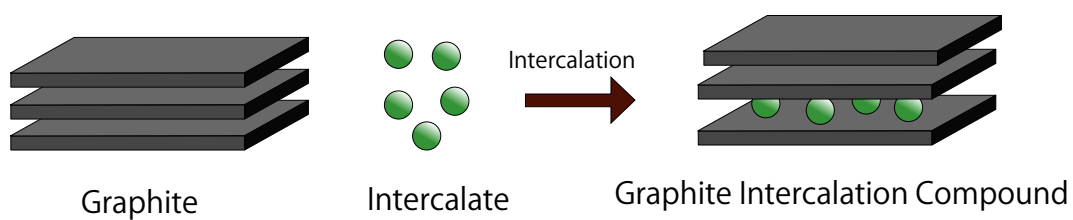


Fig. 10 Diagram of graphite intercalation compound. Intercalates were inserted between the carbon layers.