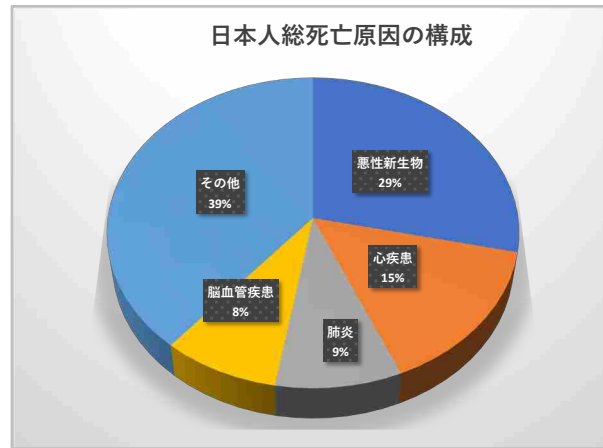


血管内治療デバイスへの応用に向けた フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン膜の評価

お茶の水女子大学大学院 人間文化創成科学研究科
理学専攻 博士後期課程
堀川あゆみ

1. イントロダクション
2. F-DLC(Fluorinated diamond-like carbon)膜の成膜、表面分析
3. 細胞を使った生物学的評価
4. 考察

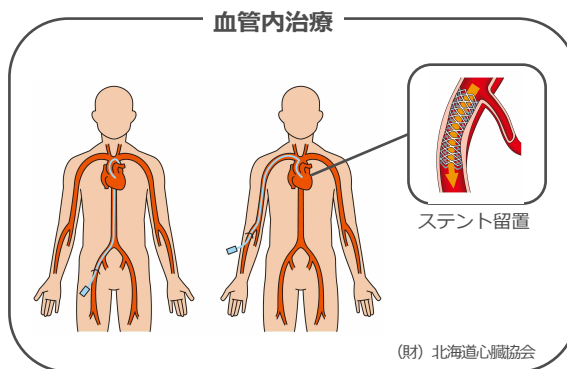
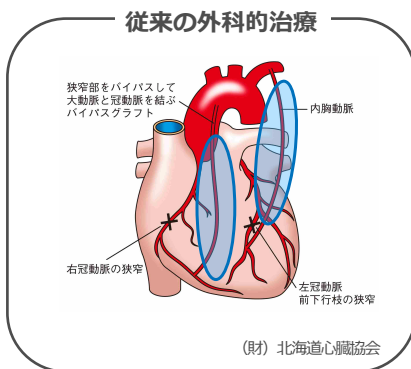
1-1. 背景



平成28年（2016） 人口動態統計（厚生労働省）

日本人の死亡原因の第二位が心疾患
このうち虚血性心疾患が4割を占める

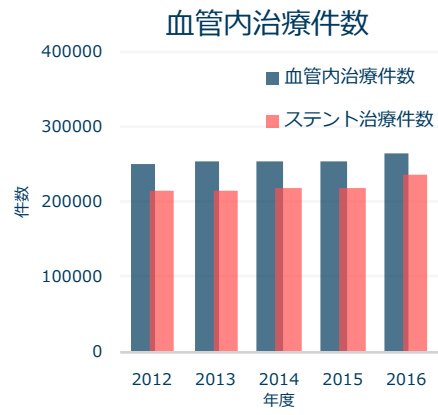
1-1. 背景



	外科的治療	血管内治療
手術時間	2-5時間	30分
入院期間	2週間	3-5日

金沢医科大学HP
<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~hospital/2012/04/-1.html>

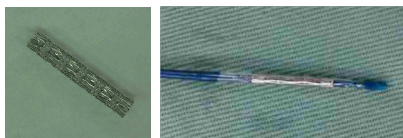
1-1. 背景



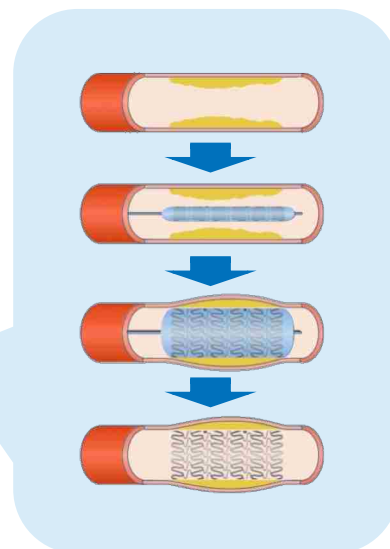
日本循環器学会；循環器疾患診療実態調査2015年報告書

1-2. ステント

- 虚血性心疾患（狭心症や心筋梗塞）の治療に使用する金属のメッシュ状のチューブ
- 狭くなったり、閉塞した血管を広げるために血管内に留置する

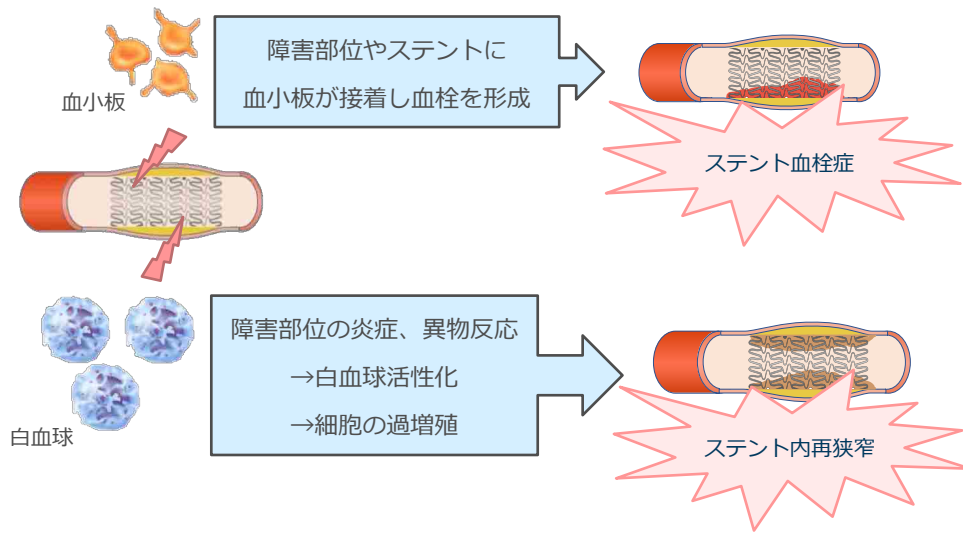


ステント バルーンにマウントしたステント



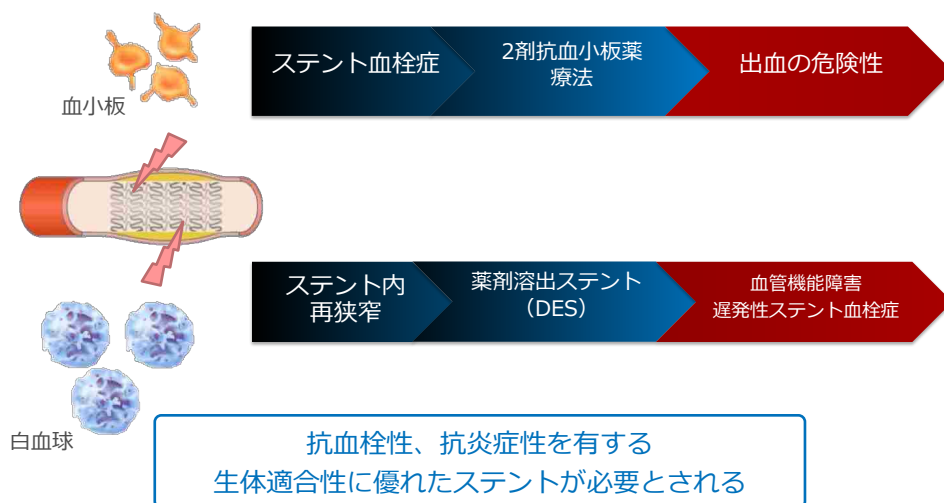
1-2. スtent

stentの問題点



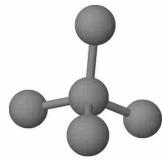
1-2. stent

stentの問題点

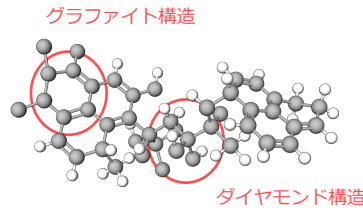


1-3. F-DLC膜

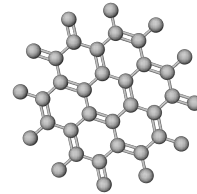
ダイヤモンドライクカーボン (DLC)



Structural of Diamond
 sp^3



Structural of DLC
 sp^2, sp^3



Structural of graphite
 sp^2

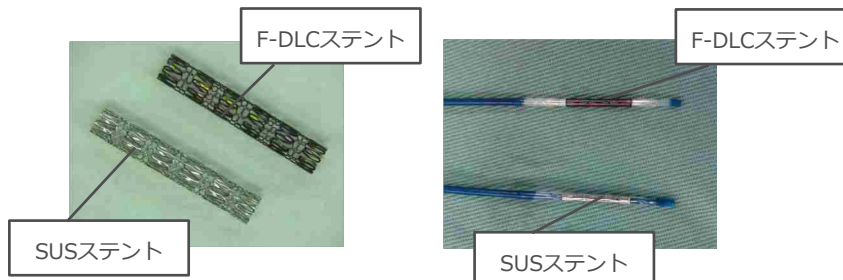
- ダイヤモンド (sp^3 結合) と炭素 (sp^2 結合) の両方を併せ持つ非晶質炭素
- 耐摩耗性, 高硬度, 化学的不活性, 耐食性, 抗血栓性 などの特徴を持つ

8

1-3. F-DLC膜

フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン (F-DLC)

- DLCにフッ素を添加して成膜する
- F-DLCは血小板の接着を抑制し抗血栓性を発揮することがわかっている
- F-DLCの非金属へのコーティングの報告は多数あるが、複雑形状かつ伸縮を繰り返すステント上への密着性の高いF-DLCコーティングは確立されていない



9

1-3. F-DLC膜

**F-DLC膜を用いて高い生体適合性を有する
ステント材料を開発する**

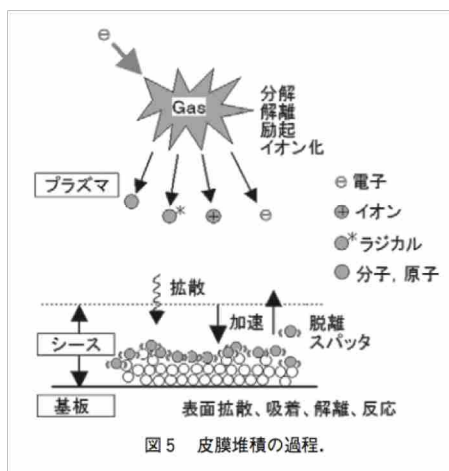
- ✓ F-DLC膜の成膜方法の確立、**表面分析**
- ✓ **細胞を使った生物学的評価 (in vitro実験)**
- ✓ in vivo実験による安全性および性能評価

10

2-1. 成膜方法

DLC膜の成膜方法 プラズマCVD法

- プラズマ化学蒸着法；
Plasma-enhanced chemical
vapor deposition (CVD)
- ガスをプラズマ化することで、
基盤表面に堆積していく



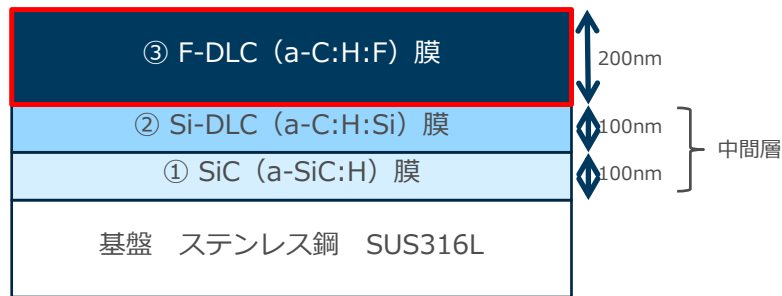
PIGプラズマCVD法によるDLCコーティング技術, 寺山,
J Plasma Fusion Res. Vol.87, No.8 (2011)

11

2-1. 成膜方法

F-DLC膜の成膜方法 プラズマCVD法

- 基盤と膜の接着性を高めるため、中間層を入れ3層構造にした
- 医療機器に用いられるステンレス鋼 SUS316Lを基盤とした
- 評価にはSUSの円形discにコーティングしたものを使用した



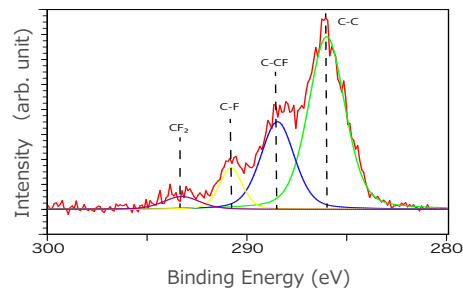
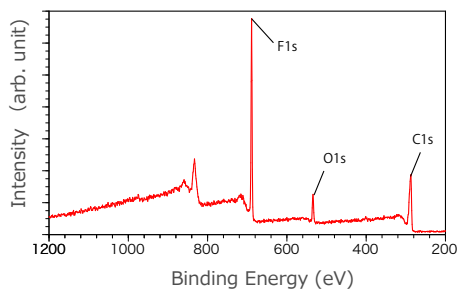
T. Hasebe et al., *Diam Relat Mater* (2011)

12

2-2. F-DLC膜の表面分析

F-DLC膜の表面分析

XPS ; X-ray photoelectron spectroscopy



34.8 ± 3.92%のフッ素を含む
CF、CF₂結合を持つ

13

2-2. F-DLC膜の表面分析

F-DLC膜の表面分析 ラマン分光法

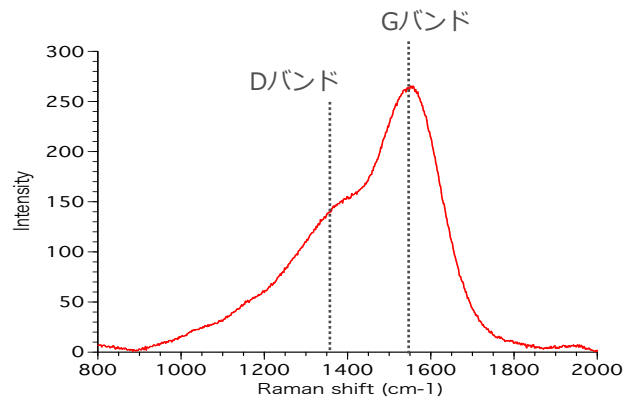


Fig.3 ラマンスペクトル

特徴的なGバンド、Dバンドを有し
sp²結合とsp³結合からなるアモルファスを形成している

14

F-DLC膜の表面分析の結果

- 30%以上のフッ素が含まれる
- CF結合、CF₂結合を有す
- sp²結合とsp³結合からなるアモルファス構造を持つ

フッ素を含むDLCを形成しており
抗血栓性を発揮することが期待できる

15

3. F-DLC膜の生物学的評価

細胞	評価項目	目的	参考
血小板 	接着	抗血栓性	T. Hasebe, 2005 S. N. Rodrigues, 2006
	活性化	抗血栓性	J. Y. Park, 2001 L. B. Koh, 2010
好中球 	接着	抗炎症性	B. Kubes, 1991 J. D. Patel, 2003
内皮細胞 	細胞による被覆	ステント被覆	T. W. Chung, 2003 Y. Yoshimoto, 2012

16

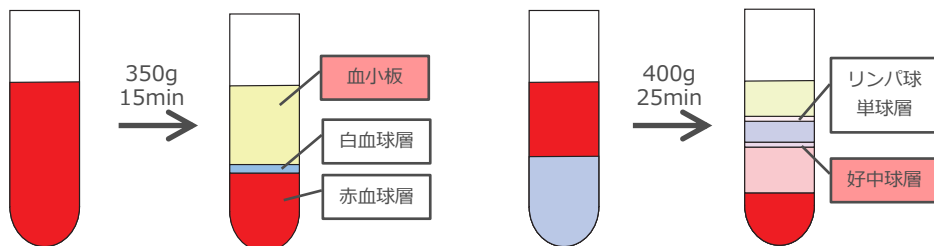
3-1. F-DLC膜の生物学的評価 血球の分離

• 血小板浮遊液の調整

85ml whole blood
 ↓ add 15ml ACD
 ↓ centrifuge at 350 g, 20°C, 15min
 ↓ collect supernatant plasma: PRP (platelet rich plasma)
 ↓ centrifuge at 1000 g, 4°C, 10min
 collect PPP (platelet poor plasma)
 PRP was Adjusted to 3.0×10^5 cells/ul by dilution with PPP.

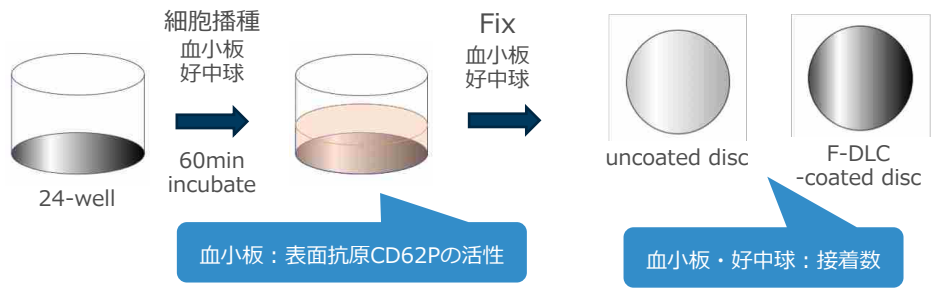
• 好中球浮遊液の調整

24ml whole blood
 ↓ layered over 21 ml of mon-poly resolving medium
 ↓ centrifuge at r.t. 400 g, 25min
 ↓ collect leukocytes or neutrophils
 ↓ fill with PBS
 ↓ centrifuge at 250 g, r.t., 10min
 ↓ suspend with 0.1% BSA/RPMI-1640
 Adjusted to 3.0×10^6 cells/ml



17

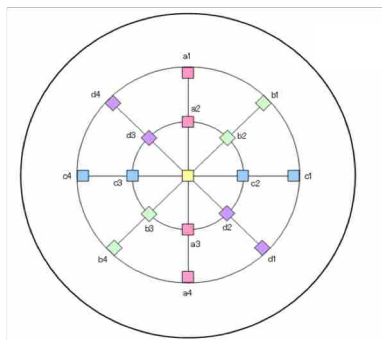
3-2. 血小板・好中球接着の抑制



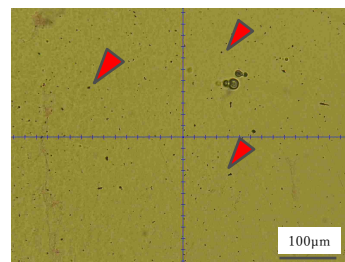
18

3-2. 血小板・好中球接着の抑制

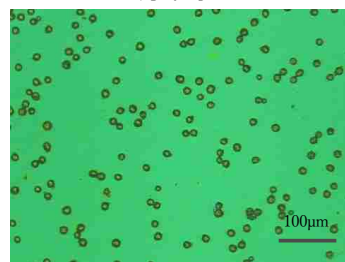
細胞接着数のカウント方法



血小板



好中球



19

3-2. 血小板・好中球接着の抑制

血小板接着の抑制

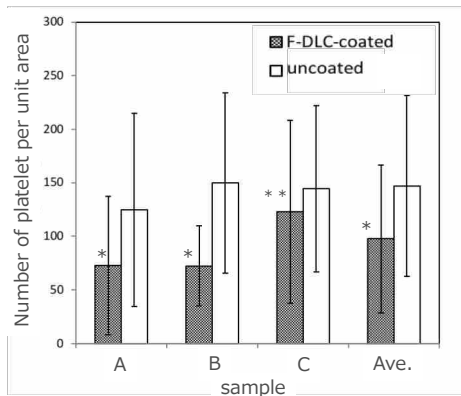
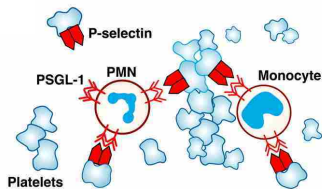
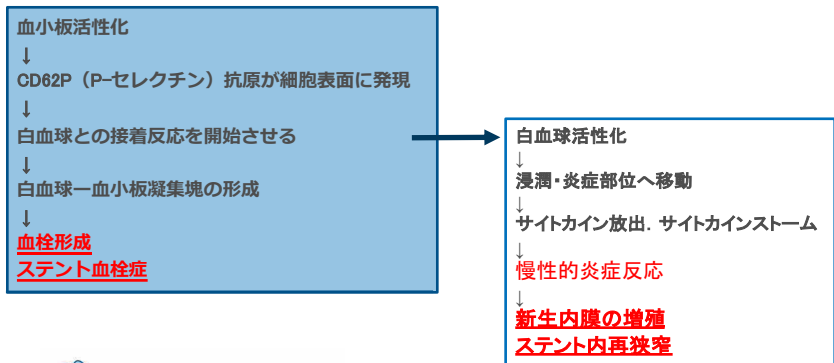


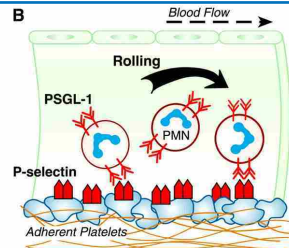
Fig.4 血小板接着数

血小板接着数が減少
↓
抗血栓性

CD62P P-selectin



G. A. Zimmerman, 2001



3-2. 血小板・好中球接着の抑制

血小板表面抗原CD62P発現の抑制

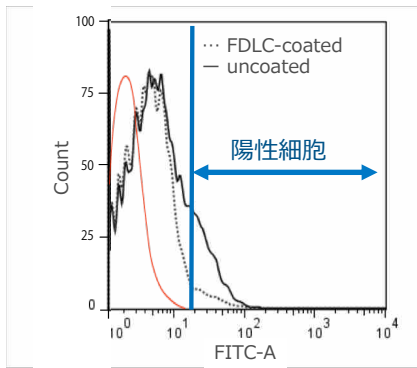


Fig.5 CD62Pヒストグラム

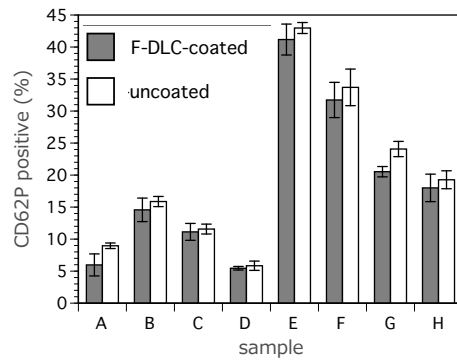


Fig.6 CD62P 陽性率

血小板表面抗原CD62Pの発現を抑制した



抗血栓性、抗炎症性

3-2. 血小板・好中球接着の抑制

好中球接着の抑制

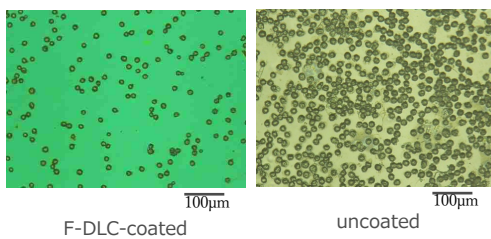


Fig.7 好中球接着

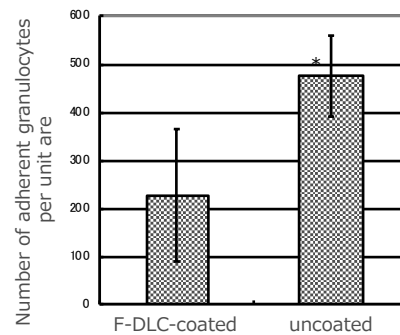


Fig.8 好中球接着数

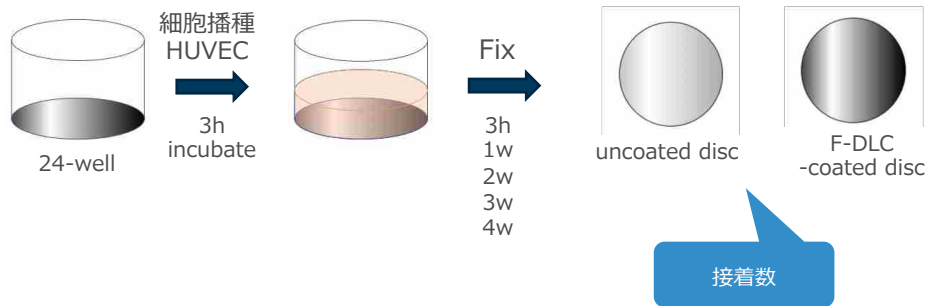
好中球の接着数が減少



抗炎症性

3-3. 内皮細胞被覆への影響

HUVEC (ヒト臍帯静脈内皮細胞) を用いて
F-DLC膜のステントの内皮細胞被覆に対する影響を評価する



24

3-3. 内皮細胞被覆への影響

内皮細胞による被覆

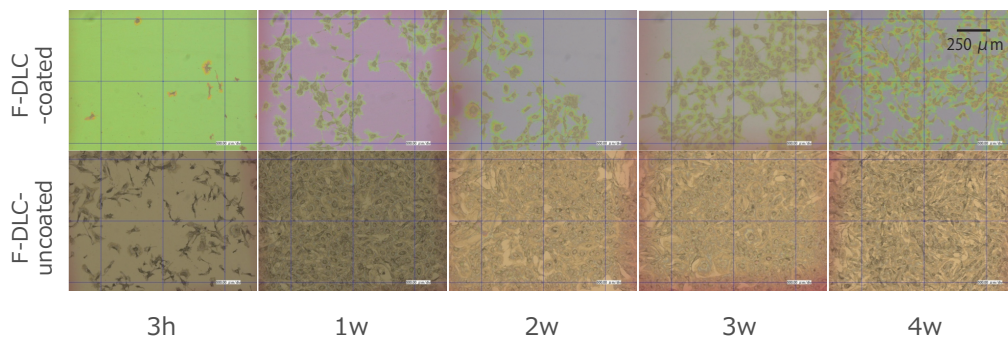


Fig.9 HUVEC接着サンプル画像

25

3-3. 内皮細胞被覆への影響

内皮細胞による被覆

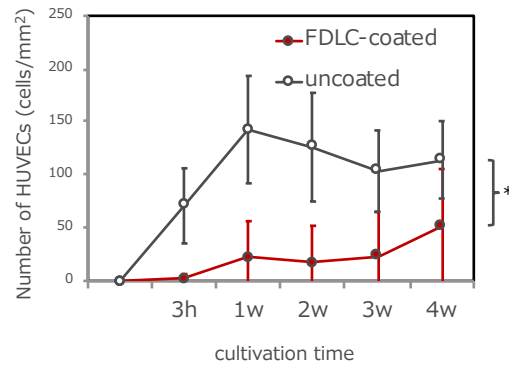


Fig.11 HUVEC増殖数

F-DLCをコーティングすると接着数が減少したが
その後増殖し続けた
→F-DLC膜表面における細胞の接着・増殖が確認できた

26

F-DLC膜の生物学的評価の結果

In vitro.

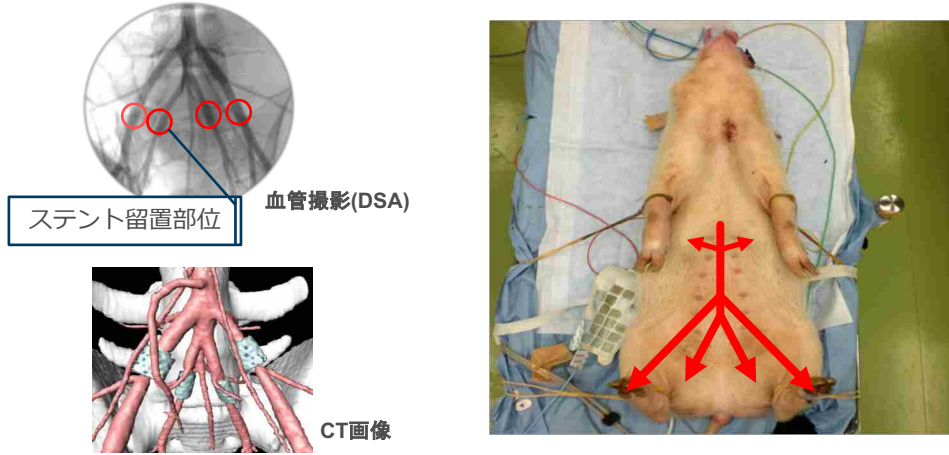
- 血小板の接着数の減少 →抗血栓性
- 血小板の表面抗原CD62Pの発現抑制 →抗血栓性・抗炎症性
- 好中球の接着数の減少 →抗炎症性
- HUVECの接着・増殖 →時間とともに細胞により被覆される

In vivo.

- ミニブタを用いたステント留置実験 (次のスライド)

27

in vivo実験 ミニブタを用いた評価



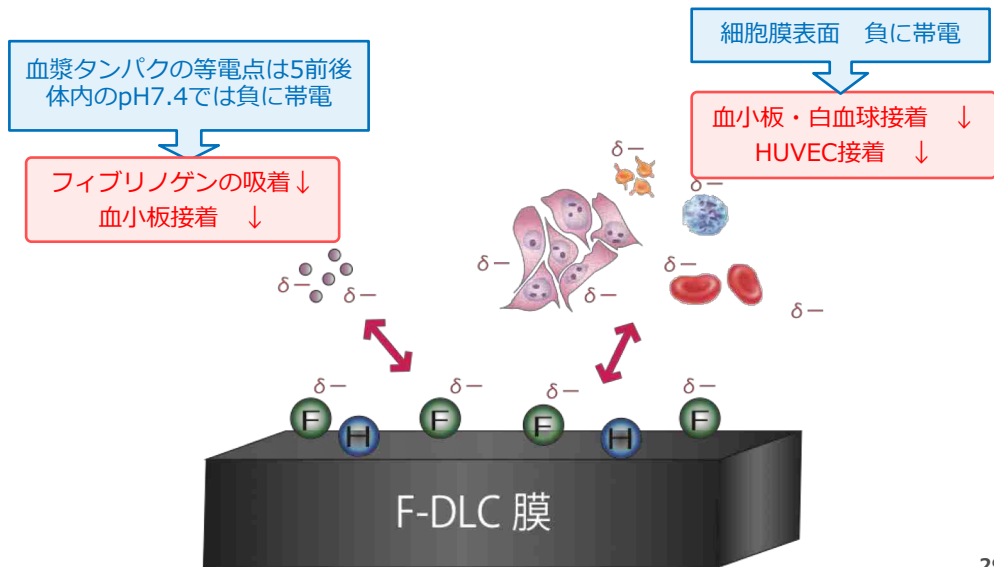
- ✓ F-DLCをコーティングしていない金属ステントと比較して、F-DLCでは狭窄率が低下。
- ✓ 薬剤（エベロリムス）溶出ステントと比較して、急性期狭窄性は高いものの、F-DLCでは肥厚内膜が時間とともに退縮し狭窄率が低下していく。

石川治, ミニブタを用いたステント評価モデルの確立とその応用: ステント内狭窄の経時的な解析. 博士学位論文, 東京大学, (2012).

28

4. 考察

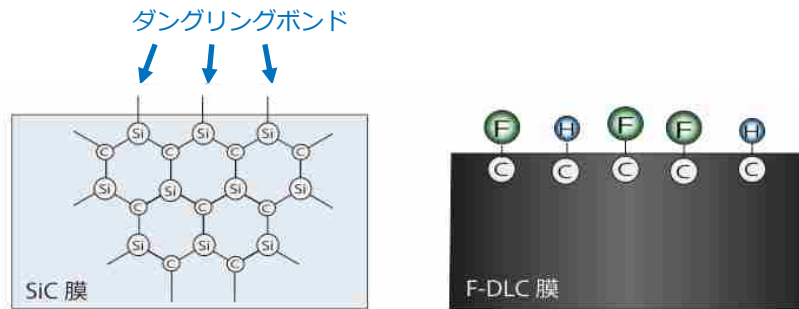
膜表面の電荷



29

4. 考察

膜表面の安定性



ダングリグボンド がほとんどなく膜表面は安定している
 低い表面エネルギー、疎水性表面
 → **血小板・白血球・HUVEC接着抑制**

30

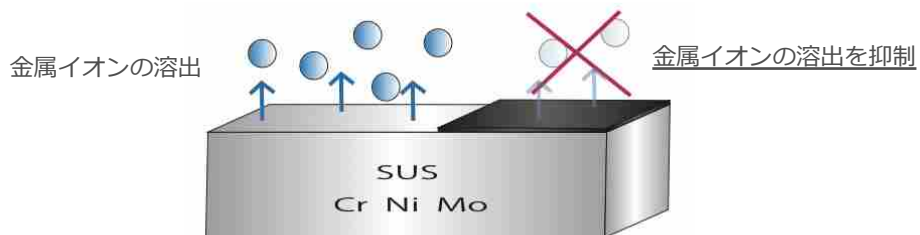
4. 考察

金属イオンの溶出抑制

金属イオン：血小板接着・CD62Pの発現を促進
 ニッケルイオン：好中球や血管内皮細胞の接着分子を活性化

血小板接着 ↑
 CD62P発現 ↑
 好中球の活性 ↑
 HUVEC接着 ↑

血小板接着 ↓
 CD62P発現 ↓
 好中球の活性 ↓
 HUVEC接着 ↓



31

総括 F-DLC膜のステントとしての特性

抗血栓性 → ステント血栓症の抑制

- 血小板の接着を抑制した
- 血小板の活性化マーカーであるCD62Pの発現を抑制した

抗炎症性 → 再狭窄の抑制

- 好中球の接着数が減少した
- CD62Pの発現を抑制することで白血球の活性化を抑制しうる

内皮細胞によるステントの被覆（内皮化）が可能

- HUVECの足場になりうる

32

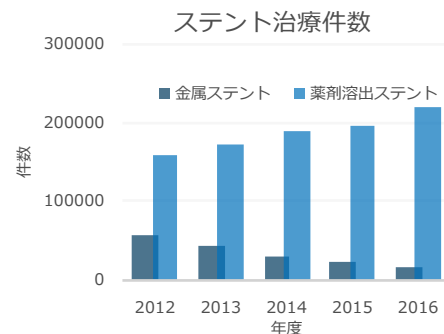
今後の展望

● F-DLCコーティングステント

- ✓ 抗血栓性、抗炎症性を発揮するステント
- ✓ 薬剤溶出ステントからF-DLCステントへの

移行によるメリット

- 薬剤投与の短期間化
- 血管機能障害の低減



日本循環器学会；循環器疾患診療実態調査2015年報告書 33

今後の展望

- F-DLCコーティングは抗血栓性、抗炎症性を発揮し
高い生体適合性を有す ⇒様々な医療機器への応用

- 血液と接触する医療機器への応用
 - ✓ カテーテル、ガイドワイヤーなどの血管内治療デバイス
 - ✓ メスやハサミなどの手術器具 等
 - ・ 血栓が生じにくい
 - ・ 摺動性の向上

34

今後の課題

- ステンットの主流となっているCo-Crへのコーティングと評価
- 細胞増殖性の向上（細胞増殖因子のコーティングなど）
- 血漿タンパク存在下における評価
- 生体内における毒性の有無
- DLCに対する優位性の確認
- F-DLC膜の構造の解明

35