

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：32661

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21760561

研究課題名（和文） 炭素系薄膜マイクロ・ナノパターンニング構造制御による薬剤徐放性ステントシステム構築

研究課題名（英文） Highly functionalized drug-eluting stent systems controlled by combining polymers with nano-/micro-patterned diamond-like carbon (DLC) films

研究代表者

長谷部 光泉（HASEBE TERUMITSU）

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：20306799

研究成果の概要（和文）：

血管内治療に用いられるインプラント器具の生体適合性向上を目標に、血液適合性・内皮細胞適合性の双方に優れた新しい表面改質技術の研究に取り組み、薬剤含浸ポリマー表面に断片化した DLC を被覆した、新しい薬剤徐放コーティング技術を開発した。DLC および血液適合性に優れたフッ素添加 DLC の内皮細胞適合性評価により、各表面が内皮細胞の増殖を阻害せず、良好な細胞の足場材料として機能する事を示した。また断片化した DLC のサイズを変更することで、薬剤徐放速度をコントロールできることを示した。更に、塩基性繊維芽細胞増殖因子（bFGF）が内皮細胞・平滑筋細胞に及ぼす影響を評価し、bFGF が内皮細胞の増殖に対し特異的に効果を及ぼすことを示唆した。これらの研究成果を組み合わせることで、留置後、早期の内皮化を実現する表面改質技術への可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this project is to develop the surface modification technique, which improve the hemocompatibility and tissue compatibility of vascular implant surface. Specifically, we designed the highly controlled new drug eluting coating by the combination of drug carrier polymer and micron-patterned diamond-like carbon (DLC) films. The main results of this project is mentioned as below, that is, 1) DLC and fluorine incorporated DLC (F-DLC) showed well compatibility with endothelial cells, then the results indicate that the DLC and F-DLC acting as platform of cells adhesion, 2) micron-patterned DLC coating well controls the drug emission from the carrier polymer and this performance is based on the piece size of micron-patterned DLC, 3) As an impregnating drug, basic fibroblast growth factor (bFGF) specifically improves the endothelial cells growth rate comparing with smooth muscle cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000円	540,000円	2,340,000円
2010年度	900,000円	270,000円	1,170,000円
2011年度	700,000円	210,000円	910,000円
年度			
年度			
総計	3,400,000円	1,020,000円	4,420,000円

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・構造・機能材料

キーワード：新機能材料・ダイヤモンドライクカーボン（DLC）

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化症を原因とした血管狭窄に対する低侵襲治療技術として「血管内治療」が広まっているが、治療に用いる血行再建用留置器具「ステント」は、器具を構成する金属材料の生体適合性が不十分であり、留置後に患部で発生する“血管の再狭窄”は患者の生死を左右する問題となっている。再狭窄を引き起こさないステント材料の開発は、治療技術の向上に寄与する重要な課題である。

再狭窄の発生は“ステント表面での血液細胞成分の付着・凝固”“ステント拡張に伴い発生する血管壁の創傷を起点とした平滑筋細胞の過剰増殖”が主要因とされ、これらを抑制する手法・材料が研究されてきた。再狭窄の発生を劇的に低下させるステントとして上市された薬剤徐放ステント (DES) は、従来の金属ステントの表面に、細胞増殖を抑制する薬剤を含浸させたポリマーを被覆し、患部で徐放することで再狭窄を防ぐため、薬剤徐放が続くかぎり効果を発揮する。一方で、この薬剤は創傷治癒に寄与する内皮細胞の増殖も阻害するため、薬効が切れたのち、治癒しなかった創傷を起点とした再狭窄が数多く報告され、“恒久的な高い生体適合性”という観点からは、DESの効能への懐疑的な意見が多く、再狭窄を防ぐステントの研究開発は、いまだ重要なテーマである。

これら臨床における問題を背景に、研究代表者は、生体適合性に優れた非晶質炭素薄膜 (DLC) に注目し、既存の DLC 薄膜よりも著しく血液付着を抑制するフッ素添加 DLC (F-DLC) を開発した。そして F-DLC を応用し、抗血栓性に優れ、細胞の過増殖を誘発しないステントの表面改質技術の研究に取り組んできた。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、研究代表者がこれまでに研究を進めてきた、生体適合性薄膜 DLC と、従来のポリマー含浸型の薬剤徐放システムを複合化した、新しい薬剤徐放システムの開発を目的とする。

具体的には、薬剤含浸ポリマー表面を、マイクロサイズに断片化した DLC により被覆し、薬剤徐放速度制御、及び長期的生体適合性の確保を併有した、新規薬剤徐放システム

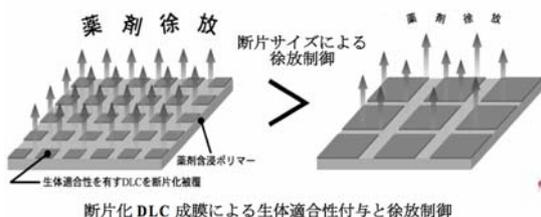


図1 新規薬剤徐放システムを設計した (図1). 薬剤含浸ポリマー上に、

血液適合性に優れ、細胞の静着も望める DLC を、マイクロサイズに断片化しコーティングすることで、薬剤徐放による平滑筋細胞の過剰増殖抑制機能と、細胞接着の足場となる断片化 DLC による内皮細胞適合性を併有した新規体内留置器具被覆技術の創製を目指す。また、既存の DES では、細胞の過増殖を抑制するために、抗癌剤が徐放されてきたが、研究代表者は、材料表面の内皮細胞適合性を向上させ、患部の内皮化を増進する事で平滑筋細胞の増殖を抑えられると考え、徐放薬剤には増殖因子を選定した。

## 3. 研究の方法

### (1) F-DLC膜上での血管内皮細胞増殖性評価

断片化被覆するDLC, F-DLCについて、内皮細胞との適合性を評価した。

高周波プラズマCVD装置を用いて35 mmセルカルチャーディッシュにDLCおよびF-DLCを成膜した。F-DLCはフッ素含有量を変化させるために、全圧 (0.10 Torr) に対するC<sub>2</sub>F<sub>6</sub>の圧力を0.02, 0.04, 0.06, 0.08 Torrと変えて成膜し、それぞれF-DLC20, 40, 60, 80と表記した。成膜したディッシュに3.5×10<sup>4</sup> cell/mlに調整した正常ヒト臍帯静脈内皮細胞

(Normal Human Umbilical Vein Endothelial Cells : HUVECs) を播種し、インキュベーター (37°C、5%CO<sub>2</sub>) 内で6日間培養した。培養2, 4, 6日目にWST-8 assayにより接着細胞数を定量した。各培養期間において各ディッシュ底面に接着した細胞を2.5%グルタルアルデヒドで固定し、蛍光顕微鏡で観察した。また、細胞接着部位に発現するビンキュリンを染色し接着斑を観察した。

### (2) 断片化被覆したDLCによる薬剤徐放制御

生体適合性に優れたポリマーに薬剤を含有させ、そのポリマー上に高周波プラズマ装置を用いてDLCを成膜した。このとき、金属製のメッシュを用いることで、ポリマー上にDLCをパターンニングし、成膜する面積を0%、35%、100%と変化させた試料を作製した。その後、作製した試料をリン酸緩衝生理食塩水中に浸漬し、ポリマーからの薬剤溶出挙動が成膜したDLCの面積に応じてどのように変化するかを評価した。

### (3) 塩基性繊維芽細胞増殖因子が内皮細胞の増殖性に及ぼす影響評価

細胞増殖因子は、特定の細胞に機能し、その増殖を促す蛋白質である。塩基性繊維芽細胞増殖因子 (bFGF) は、新生血管増殖因子として注目されており、本研究では、材料表面

の内皮化を促進する徐放薬剤として bFGF を選定し、内皮細胞増殖にあたる影響を評価した。具体的な研究方法は以下の通りである。

- ① 細胞増殖はマルチプレートに 20000 cell/ml で細胞を播種し、subconfluent になったところで bFGF を添加し、添加後 1, 3, 5 日目の増殖を CCK-8 Kit を用いて吸光度を測定した。
- ② 細胞遊走はメンブレン付きマルチプレートに 1000000 cell/ml で細胞を播種し、メンブレン下部に遊走した細胞を蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察し、画像解析ソフトで遊走した細胞の面積比として換算した。
- ③ bFGF 濃度 1, 10, 100 ng/ml で培養した HUVEC から蛋白を抽出し、ウエスタンブロット法で各濃度における eNOS の発現を評価した。

#### 4. 研究成果

##### (1) F-DLC膜上での血管内皮細胞増殖性評価

6日間の培養実験において、DLC・F-DLC各膜上で細胞は培養日数の経過に伴い増殖し、HUVECに対する薄膜の毒性は示されなかった。一方、培養2, 4日目のF-DLC80はDLCに比べ生細胞量が有意に少なく、薄膜中のフッ素添加量によっては、初期的な細胞接着量に影響を及ぼす可能性を示唆された。また、ビンキュリン染色による接着斑の観察ではF-DLC膜上でビンキュリンの発現が少なく、フッ素添加によって細胞の接着が弱くなることが確認された。しかし、培養6日目にはF-DLC80を含む各膜種間で生細胞量に有意な差はなく、培養日数の経過に伴いF-DLC80上でもDLCと同程度まで細胞が増殖することが明らかとなった。すなわち、膜のフッ素含有量は初期的な細胞接着に影響を及ぼす可能性があるが、培養日数が経過するとフッ素含有量に依らずHUVECが増殖することが明らかとなった。

以上の結果は、図3の蛍光顕微鏡像からも確認することができ、培養6日目では全てのサンプルで同程度細胞が増殖していることが観察された。以上の成果はF-DLC膜が優れた細胞適合性を有することを示しており、新規薬剤徐放システムにおいて、断片化F-DLCが細胞接着の足場として機能すると期待できる。

##### (2) 断片化被覆したDLCによる薬剤徐放制御

メッシュを用いてDLCの断片化被覆の可否を確認した。シリコン基板上にメッシュを乗せDLCを成膜した試料を、光学顕微鏡によって観察した。観察結果を図4に示す。図4 (a), (b) より、メッシュを用いた成膜法によ

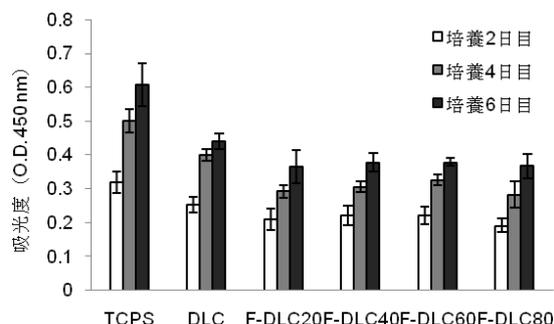


図2 WST-8 assayによる細胞数の定量結果

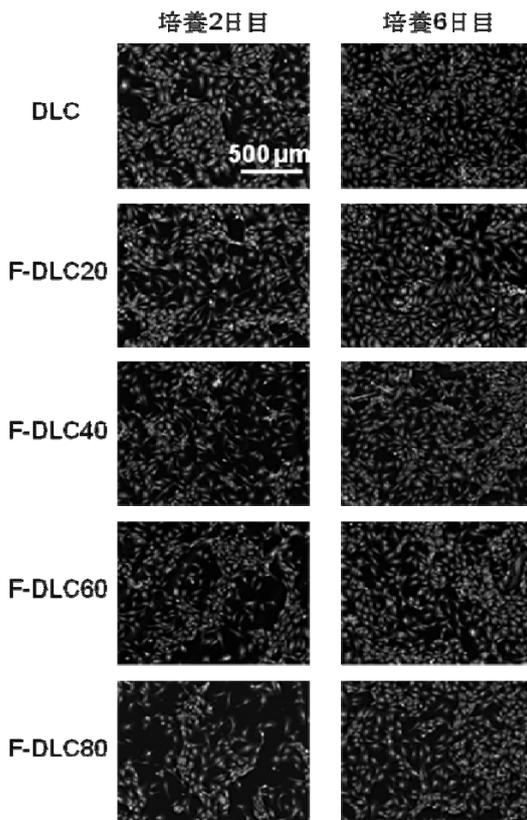


図3 蛍光顕微鏡像

り、シリコン基板が断片化DLCによって被覆できることを確認した。

次に、DLCの成膜面積を変えた試料ごとに薬剤溶出実験を行った結果を図5に示す。各表面の薬剤徐放特性の時間依存性を示す本グラフより、DLCを成膜していない試料からの薬剤溶出では、初期に多くの薬剤が溶出してしまっていることが示唆される。一方、DLCを35%および100%成膜した試料では、未処理のものに比べ薬剤溶出量が減少するとともに、処理面積が増えるにしたがって溶出量が減少している。以上の結果から、メッシュを用いてDLCをパターニングするとともに、パターニングする面積を変えることで薬剤の溶出量を制御することに成功した。

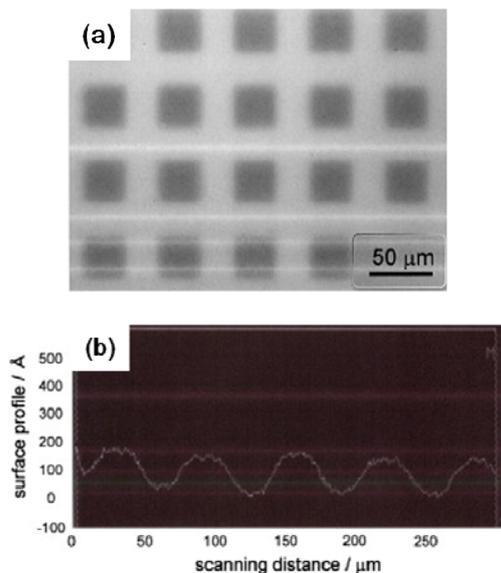


図4 光学顕微鏡による基板の観察(×200) :  
(a) シリコン基板上にDLCをパターンニングした試料の顕微鏡像, (b) 試料の表面形状

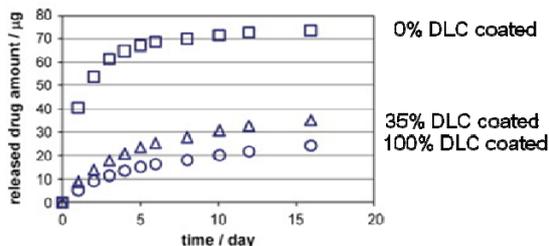


図5 ポリマーからの薬剤溶出量

### (3) 塩基性繊維芽細胞増殖因子が内皮細胞の増殖性に及ぼす影響評価

内皮細胞はbFGF 10 ng/mlをピークに濃度依存性に増殖および遊走を示した。平滑筋細胞は増殖および遊走を示すが、濃度による差はみられなかった。また、血管拡張作用の指標としてeNOSの発現をみたところ、bFGF 10 ng/mlで最も発現が高かった。これらより、bFGFは至適濃度10 ng/mlで平滑筋細胞の過増殖なく、ステント内腔の内皮細胞の早期被覆に有用であると考ええる。

本研究の成果をまとめる。

- ① フッ素添加量の如何に関わらず、F-DLC表面では内皮細胞が増殖し、各表面間で増殖性に及ぼす有意な影響は無かった。
- ② 薬剤含浸ポリマー表面に断片化したDLCを被覆する事で、薬剤徐放特性を制御できることを見出した。これにより、既存の薬剤徐放ポリマーとDLCを複合化した新たな薬剤徐放システムを構築した。
- ③ bFGFの、内皮細胞、および平滑筋細胞の増殖特性への影響を評価した結果、bFGFは

内皮細胞の増殖性に対して、濃度依存的に影響を及ぼす一方、平滑筋細胞に対しては、濃度依存性を示さなかった。これは、bFGFの濃度を制御することで内皮細胞に対し特異的に増殖効果を向上させる可能性を示唆する。

本研究課題の当初の計画では、実際にbFGFを含浸させた徐放ポリマー上に断片化DLCを被覆し、血液適合性、内皮細胞増殖性を評価することが含まれていたが、蛋白質を含浸させた徐放ポリマーの合成技術を十分に完成させるには至らなかった。

新しい徐放システムの早期実現を目指し、今後も継続的に研究に取り組む。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計9件)

- ① Nagashima S, Hasebe T, Tsuya D, Horikoshi T, Ochiai M, Tanigawa S, Koide Y, Hotta A, Suzuki T, Controlled formation of wrinkled diamond-like carbon (DLC) film on grooved poly (dimethylsiloxane) substrate, *Diamond and Related Materials* 22 (2012) 48-51. 査読有
- ② Hasebe T, Nagashima S, Yoshimoto Y, Hotta A, Suzuki T, Tailoring surface topographies of polymers by using ion beam: Recent advances and the potential applications in biomedical and tissue engineering, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 282 (2012) 134-136. 査読有
- ③ Asakawa R, Nagashima S, Nakamura Y, Hasebe T, Suzuki T, Hotta A, Combining polymers with diamond-like carbon (DLC) for highly functionalized materials, *Surface and Coatings Technology* 206 (2011) 676-685. 査読有
- ④ Hasebe T, Murakami K, Nagashima S, Yoshimoto Y, Ihara A, Otake M, Kasai R, Kasuya S, Kitamura N, Kamijo A, Terada H, Hotta A, Takahashi K, Suzuki T, Design for improved adhesion of fluorine-incorporated hydrogenated amorphous carbon on metallic stent: three-layered structure with controlled surface free energy, *Diamond and Related Materials* 20 (2011) 902-906. 査読有
- ⑤ 長谷部光泉, 吉本幸洋, 永島壮, 上條亜紀, 堀田篤, 高橋孝喜, 鈴木哲也, 炭素系素材の将来展望—2050年に向けて—DLC薄膜を用いた新世代医療器具の開発, *New Diamond* Vol. 27 (2011) 66-77. 査読有
- ⑥ 長谷部光泉, 正林康宏, 吉本幸洋, 永島壮, 笠井ルミ子, 粕谷秀輔, 北村範子, 稲岡努, 寺田一志, 谷下一夫, 鈴木哲也, 新

しいデバイス開発 2: ステント・ステント  
グラフト, IVR学会誌 26 巻 (2011) 267-277.  
査読有

- ⑦ 長谷部光泉, 高橋孝喜, 長期の生体適合性に優れた血管内ステントの開発, 医学のあゆみ 237 巻 (2011) 908-910. 査読有
  - ⑧ Hasebe T, Enomoto K, Asakawa R, Kamijo A, Yoshimoto Y, Suzuki T, Takahashi K, Hotta A, Controlling the drug release rate from biocompatible polymers with micro-patterned diamond-like carbon (DLC) coating, *Diamond and Related Materials* 19 (2010) 806-813. 査読有
  - ⑨ Hasebe T, Nagashima S, Kamijo A, Yoshimoto Y, Hotta A, Morita H, Terada H, Tanaka M, Takahashi K, Suzuki T, Effect of oxygen plasma treatment on non-thrombogenicity of diamond-like carbon, *Diamond and Related Materials* 19 (2010) 861-865. 査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- ① Hagiwara K, Hasebe T, Suzuki T, Hotta A, Effects of argon plasma treatment on controlling the drug release rate from biocompatible polymers 38th International Conference on Metallurgical Coatings & Thin Films, April 27th, 2012, Town & Country Resort Hotel and Convention Center (San Diego, California, USA).
  - ② Hagiwara K, Hasebe T, Asakawa R, Kamijo A, Suzuki T, Hotta A, Controlling the drug release from biocompatible polymers by changing plasmatreated area 38th International Conference on Metallurgical Coatings & Thin Films, April 26th, 2012, Town & Country Resort Hotel and Convention Center (San Diego, California, USA).
  - ③ 北川智也, 長谷部光泉, 吉本幸洋, 永島壯, 藪野元, 堀越拓, 鈴木哲也, フッ素添加ダイヤモンドライクカーボン上における血管内皮細胞適合性評価, 第 25 回ダイヤモンドシンポジウム, 2011 年 12 月 7 日, 産業技術総合研究所 (つくば市).
  - ④ 吉田創貴, 鈴木哲也, 堀田篤, 長谷部光泉, 上條亜紀, リン脂質ポリマーナノファイバーの作製とその薬剤徐放性評価, 平成 23 年度繊維学会年次大会, 2011 年 6 月 8 日, 船堀ホール (東京都).
  - ⑤ Hasebe T, Murakami K, Nagashima S, Yoshimoto Y, Ihara A, Kasai R, Kasuya S, Terada H, Kamijo A, Hotta A, Takahashi K, Suzuki T, Improved Adhesion of Fluorine-doped Amorphous Carbon on Metallic Stent for Cardiovascular Disease by Introducing Interlayers with Controlled Surface Free Energies, 8th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New

Materials and Devices '11, May 22nd-27th, 2011, Seoul (Korea).

- ⑥ Hasebe T, Nagashima S, Yoshimoto Y, Kamijo A, Hotta A, Suzuki T, Surface modification of polymers by ion beam irradiation for biomedical applications, The European Materials Research Society (E-MRS) Spring Meeting 2011, May 9th-13th, 2011, Nice (France).
- ⑦ 長谷部光泉, 吉本幸洋, 上條亜紀, 堀田篤, 村上和範, 永島壯, 高橋孝喜, 鈴木哲也, フッ素添加非晶質炭素薄膜を被覆した抗血栓性ステントの開発, 第 24 回ダイヤモンドシンポジウム, 2010 年 11 月 19 日, 東京工業大学 (東京都).
- ⑧ 長谷部光泉, 炭素系薄膜マイクロパターンニング構造制御による薬剤徐放ステントの開発, 第 64 回東邦医学会総会, 2010 年 11 月 11 日, 東京 (日本).
- ⑨ 長谷部光泉, 堀田篤, 上條亜紀, 高橋孝喜, 鈴木哲也, 医工産学連携プロジェクトによる次世代生体適合性ステントの開発, 第 2 回大分分野融合セミナー, 2010 年 9 月 13 日, 大分全日空ホテル (大分市).
- ⑩ Hasebe T, Murakami K, Hotta A, Kamijo A, Takahashi K, Suzuki T, Design for improved adhesion of fluorine-incorporated hydrogenated amorphous carbon on metal stent: three-layered structure with controlled surface free energy, 21st European Conference on Diamond, Diamond-Like Materials, Carbon Nanotubes, and Nitrides (Diamond 2010), September 7th, 2010, Kempinski Hotel Corvinus (Budapest, Hungary).
- ⑪ 長谷部光泉, 吉本幸洋, 永島壯, 上條亜紀, 堀田篤, 高橋孝喜, 鈴木哲也, Recent advances in plasma-modified diamond-like carbon coatings for blood-contacting medical devices, (日本学術振興会 榊奨励賞 受賞講演), 独立行政法人 日本学術振興会 マイクロビームアナリシス第 141 委員会 第 141 回研究会, 2010 年 8 月 30 日, 名古屋大学 (名古屋市).
- ⑫ Hasebe T, Kamijo A, Nagashima S, Yoshimoto Y, Ueda Y, Kitamura N, Morita H, Tanaka M, Hotta A, Terada H, Takahashi K, Suzuki T, Recent advances in plasma-modified diamond-like carbon coatings for blood-contacting medical devices, The European Materials Research Society (E-MRS) Spring Meeting 2010, June 8th, 2010, Congress Center (Strasbourg, France).
- ⑬ Hasebe T, Hotta A, Yoshimoto Y, Nagashima S, Morita H, Kamijo A, Terada H, Takahashi K, Suzuki T, Coating nanotechnology for cardiovascular and interventional devices, 9th Asian-Pacific Congress of Cardiovascular &

Interventional Radiology (APCCVIR), June 1st-4th, 2010, Seoul (Korea).

- ⑭ 浅川玲奈, 長谷部光泉, 鈴木哲也, 堀田篤, ダイヤモンドライクカーボン (DLC) とポリマーの生体適合性と薬剤溶出性, 第 59 回高分子学会年次大会, 2010 年 5 月 26 日, パシフィコ横浜 (横浜市).
- ⑮ 長谷部光泉, 北村範子, 蛭田啓之, 岩下洋一, フッ素添加 diamond-like carbon (F-DLC) の実用化に向けた血管壁細胞適合性評価, 第 135 回東邦医学会, 2010 年 2 月 19 日, 東京 (日本).
- ⑯ Hasebe T, Kamijo A, Nagashima S, Yoshimoto Y, Ueda Y, Kitamura N, Morita H, Tanaka M, Hotta A, Terada H, Takahashi K, Suzuki T : Diamond-like carbon films for blood-contacting medical devices: Plasma-modified biomimetic surface, 7th International Symposium on Atomic Level Characterizations for New Materials and Devices '09, December 6th-11th, 2009, Maui (Hawaii, USA).
- ⑰ 長谷部光泉, 北村範子, 粕谷秀輔, 笠井ルミ子, 工藤秀康, 中塚智也, 森田英夫, 堀田篤, 上條亜紀, 鈴木哲也, 高橋孝喜, 寺田一志, 脳血管内治療用デバイスに対する抗血栓性コーティングの試み: 生体細胞膜模倣構造を持つ MPC コーティング, 第 25 回 NPO 法人日本脳神経血管内治療学会総会, 2009 年 9 月 19-21 日, 富山 (日本).
- ⑱ 長谷部光泉, 柏木洋介, 上田芳人, 吉本幸洋, 永島壮, 北村範子, 森田英夫, 上條亜紀, 堀田敦, 寺田一志, 高橋孝喜, 鈴木哲也, DLC の医療分野における応用最前線: 心臓血管用デバイスへの応用研究, 第 120 回表面技術協会講演大会, 2009 年 9 月 17-18 日, 千葉 (日本).
- ⑲ Hasebe T, Biomimetic surface modifications for cardiovascular medical devices, The 3rd Interventional Radiology Case Club (IRCC), June 6th, 2009, Seoul (Korea).
- ⑳ Hasebe T, Yoshimoto Y, Ishikawa O, Nagashima S, Ueda Y, Kitamura N, Kasuya S, Terada H, Tanaka M, Suzuki T, Kamijo A, Takahashi K, Challenges in prevention and treatment of late stent thrombosis: Fluorine incorporated diamond-like carbon nano-coatings, 17th Asian Pacific Congress of Cardiology, May 20th-23rd, 2009, Kyoto (Japan).

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長谷部 光泉 (HASEBE TERUMITSU)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号: 20306799

(2) 研究分担者  
該当者なし

(3) 連携研究者  
該当者なし