

ダイヤモンドライクカーボンおよび フッ素添加ダイヤモンドライクカーボンの医用応用 ～医療応用目的のナノメディカルデバイス研究開発の基盤作りについて～

長谷部光泉^{*,**}, 上條重紀^{***}, 堀田 篤^{*}, 高橋孝喜^{***}, 鈴木哲也^{*}

^{*}慶應義塾大学大学院 理工学研究科 環境・資源・エネルギー専修 理工学部機械工学科
(〒223-8522 神奈川県横浜市日吉 3-14-1)

^{**}国家公務員共済組合連合会 立川病院 放射線科(〒190-8531 東京都立川市錦町 4-2-22)

^{***}東京大学医学部附属病院 輸血部(〒113-8655 東京都文京区本郷 7-3-1)

Diamond-Like Carbon and Fluorinated Diamond-Like Carbon Films for Cardiovascular Medical Devices

Terumitsu HASEBE^{*,**}, Aki KAMIJO^{***}, Atsushi HOTTA^{*}, Koki TAKAHASHI^{***}
and Tetsuya SUZUKI^{*}

^{*}Center for Science of Environment, Resource and Energy, Keio University Faculty of Science and Technology
(3-14-1, Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223-8522)

^{**}Department of Radiology, Tachikawa Hospital(4-2-22, Nishiki-cho, Tachikawa-shi, Tokyo 190-8531)

^{***}Department of Transfusion Medicine, the University of Tokyo Hospital(7-3-1, Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655)

Key Words : Diamond-Like Carbon (DLC), Fluorinated Diamond-Like Carbon, Medical Devices, Surface Coating, Nanotechnology

1. はじめに

わが国の主な疾患死亡原因である、がん、白血病、動脈硬化に関連する脳梗塞・脳出血などの脳血管障害や心筋梗塞などの生活習慣病に対し、医学、生命科学のみならず工学を含む科学技術全般の進歩を活かした質の高い医療が実現することが期待されている。上記の疾患の治療、予防は今日の医学、医療の主要な研究課題の一つであり、前者のがん治療に関しては、エコー、CT、MRIなどの画像診断を含む検査法が進歩したこと、定型の手術に加え腹腔鏡や胸腔鏡などの内視鏡を使用する低侵襲手術が普及したことなどが治療成績の向上をもたらしている。生活習慣病(いわゆる成人病)に関しては、高血圧、糖尿病、動脈硬化などが相互に密接に関連する危険因子であると注目され、合併症を含む病態の診断、薬剤療法の進歩および血行再建療法の普及により、延命効果とともにQOL(quality of life)を改善する効果が得られている。さらには新しい医療として、骨髄バンクおよび臍帯血バンクの発展により白血病などの血液疾患に対する根治的な治療法としての造血幹細胞移植が定着し、細胞免疫療法、再生医療、遺伝子治療が新しい有望な医療として模索されつつある。端的に言えば、現代科学技術の恩恵を享受した極めて高い水準の医療が実践されつつあると言って良いように思われる。

しかしながら我が国では、医療用具の研究、開発については、ユーザー側である医療サイドの関与が従来乏しく、有用

な「ものづくり」に必要不可欠である「医工連携」システムが真の意味では確立されていないという重大な問題があると考えられる。現在広く臨床使用されている医療用具の多くが外国で開発された製品であり、国内から供給される割合は極めて小さいという事実がその証左である。さらに重要なことは、長期的な生体適合性あるいは耐用性の問題が十分検討されているとは言い難いという現状である。たとえば、一般的治療として使用されるようになってきた、人工血管、ステント、人工骨、人工関節、歯科インプラントなどを10年以上生体内に留置した場合の安全性についてはなお未知の部分が多い。免疫という異物を排除する生物固有のシステムを有し、細菌感染の危険に不断に晒され、さらに凝固系の活性化によって重大な血行途絶などの問題を惹起する恐れがある生体内に、長期間にわたり留置し得る医療用具の開発は必ずしも容易でないと思われる。厳しい条件をクリアーするために、医学・医療分野の研究者が医療現場のニーズを集約し、共通の目標、共通の問題意識の下に、医学および工学の研究者らが有機的に協力する「医工連携」研究チームにより、ナノメディカルデバイスの開発を進めていくことが重要と考えている。

我々が検討している「フッ素添加DLCによる抗血栓性コーティング」は、工学系研究者の基礎的な検討を踏まえ、上記の厳しい条件の医療応用の可能性を追求しているところである。医療用具に関する厳しい要求を日常的に感じている

医療関係者と「ものづくり」の専門家の自由なディスカッションに基づく共同作業により、ブレークスルーが期待できると実感しており、日本が得意とするナノテクノロジー分野と医療機器分野との融合から、最終的には新しい日本発の医療機器を開発、商品化できると期待している。本稿では工学・医学の緊密な連携と、有機・無機材料の垣根を超えた我々の開発研究状況について解説したい。

2. 生体適合性材料(バイオマテリアル)研究とナノテクノロジー

バイオマテリアルという言葉が生まれて久しい。現在までのところ、金属、セラミックス、高分子(ポリマー)が有力なバイオマテリアルとして生体内で利用されてきた。バイオマテリアルに求められる条件は、「生体に優しくかつ安全性が高い材料」ということが大前提である。生体内に埋め込まれて使用される場合は、材料の機械的な特性として、生体組織に和み、生体組織を傷つけないものが求められる。そういう意味においては、たとえば硬いプラスチックよりは、柔軟なプラスチックあるいはゴムが使われた方がよいことになる。また、たとえば人工関節として使用する場合は、局所において大きな荷重が長期的にかかるため、弾性や繰り返し弾性回復能の他、力学的耐久性をもったバイオマテリアルが必要とされ、現状ではセラミックや、金属材料が用いられている。

生物学的な特性としてバイオマテリアルに要求される条件は、生体側に特有の炎症反応や、免疫反応を過剰に惹起しない物質・材質であることが絶対条件である。つまり「生体適合性」を有することが重要である。生体適合性の有無は、生物細胞培養実験や動物の皮下埋め込み実験などによって従来から評価研究されている。このようにバイオマテリアルを「bulk」として生体内で評価することは非常に重要である。しかしながら、バイオマテリアルの「真の生体適合性」を追究していくためには、反応の主座となる「生物細胞と人工材料の界面」についてナノ・ミクロンレベルで解き明かすことがナノテクノロジー応用のターゲットを決定する上で最も重要なプロセスとなると考える。

「抗血栓性」も生体適応に要求される代表的な性質の一つといえる。バイオマテリアルの抗血栓性を向上させるためには、血液成分に含まれるたんぱく質・血小板などが材料表面に付着凝集を防止することが重要である。開発の一例としては、生体に類似した脂質膜構造(MPC; 2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンなど)や、薬物(ヘパリンなど)を含有し付着を防ぐ高分子材料やコーティング技術などの研究が行われている。抗血栓性については、以前は単に「血液が付着しやすい、しにくい」といった原始的な評価方法が議論の中心であったが、現在では、血液が付着するマテリアル界面そのものの性質の直接的な結果として抗血栓性が発揮されることが解明されつつあり、物質表面自由エネルギー、親水性・疎水性、さらにはミクロ相分離からくるナノ表面構造が抗血栓性に関与するといわれている。ただし、物質の表面エネルギーを単純に上昇させる、あるいは親水性・疎水性を付与することが抗血栓性効果を常にもたらすかとい

えば、必ずしも一律ではなく、マテリアルごとに複雑な因子が関連する。生物学的な観点からは、血小板、白血球、血漿タンパクの付着の仕方、また血小板や白血球などが物質表面の何を認識して抗血栓性を発揮するのか、また、工学的な観点からは、親水性か疎水性か、膜の表面の化学的組成や表面性状(表面粗さ、表面組織、表面の一定の規則性や多孔性表面など)がどのように抗血栓性に影響するかなどの研究結果が待たれる。

以上述べてきたように、バイオマテリアル界面における生体適合性・抗血栓性に関与するすべてのファクターを検討することによって、材料表面をナノレベルで改質し(ナノテクノロジー)、「究極」の生体適合性・抗血栓性を有するバイオマテリアルを創造することが今後の重要課題となっている。

3. 高分子(ポリマー)と医療材料

高分子はその無限な化学構造からくる多様性、多機能性、柔軟性などから、バイオマテリアルとして最も用いられている材料の一つである。本来、生体は水を含むゲルといえるほどそれ自身がいわゆる「高分子材料」ともいえることから、生体内に使われる材料として高分子が注目されているのは理にかなっているといえる。高分子は生体医療用器具として既に多く使用され、その利用分野は大きく3つに分けることができる。第一に、医療用器具としての用途である。第二に人工臓器としての用途である。そして第三に薬品(ドラッグ)としての用途である。

医療用器具の例としてはカテーテル、注射筒、各種医療バッグ(血液バッグなど)、診断や治療用手術器具などがあげられ、ポリエチレン(PE)、ポリプロピレン(PP)、ポリスチレン(PS)などの汎用プラスチックからポリカーボネート(PC)、ポリウレタン(PU)、ポリテトラフルオロエチレン(PTFE)、エチレン-酢酸ビニル共重合体(EVA)、シリコーンゴムなどのさまざまなプラスチックやゴムが用途別に使われている。これらは血液や薬品と接触するため、耐久性、抗血栓性が要求される。

人工臓器として、高分子(ポリマー)が我々の生活に最も身近に使われているのはコンタクトレンズであろう。これには柔らかいポリメタクリル酸メチル(PMMA)が使われている。さらには人工腎臓や人工心臓、人工血管など生体の臓器といわれているほとんどのものを含め、酸素運搬を目的とした人工血液までもにポリマーが応用される時代となっている。

薬品としての高分子の代表例はドラッグデリバリーシステム(DDS)であろう。ここでも高分子はドラッグキャリアミセルやスフィアとしてその材料あるいは生成に大きく関与している。DDSとして使用する場合は、使用薬物との組み合わせることが可能でかつ、薬物除放スピードをコントロールできることが必須となる。さらには薬物を放出し終わった後のポリマーそれ自身が、体内で有害作用を及ぼさないことが求められる。臓器の代替としての高分子においては、単に材料のメカニカルな特性および生体適合性を付加するだけでは不十分で、高分子それ自体または加工後の高分子に高機能性を付与し、全体として、複雑な生体機能を代替する“バイオマシン”を創り上げることが最終目標となる。薬剤としての

高分子には、上記メカニカル特性、生体適合性、高機能性はもちろん、ナノ・ミクロンサイズでの制御も必要となってくるため、ナノマテリアルとしての制御構造・自己組織化などが必要となってくる。このように高分子の医療応用は、バイオマテリアル・ナノ材料という時代のまさに最先端をいく研究開発が行われている分野である。医療分野においては、高分子材料はそれ単独だけではなく、他金属材料等とも組み合わせられて使用できる、あるいはコーティングのための中心的な基板となりうる可能性があり、さらにその応用範囲が拡大されてきている。

4. ダイヤモンドライクカーボン(無機物)の特徴と医用応用

バイオマテリアルの生体適合性・抗血栓性改善の方法の一つとして、薄膜を用いたコーティングによる表面改質が挙げられる。人体は主に炭素と水素で構成されており、炭素系薄膜は生体適合性膜として可能性があると古くから注目されていた。炭素の特徴は1) 原子番号が6と低原子番号であり、また2) 周期律表ではSiの上に位置し、半導体の性質も有する。さらに、3) シグマ結合とパイ結合を有することから、他の元素に見られない特性を示す。

我々が注目しているダイヤモンドライクカーボン(Diamond-like carbon: 以下DLC)はダイヤモンドとグラファイトの中間の特性を有し、ガラスと同様に非晶質無機物である。硬さはセラミックスのように硬く、また摺動特性に優れ、宇宙材料としてもNASAでの使用実績がある。近年、DLC膜の優れた機械的特性を利用したベンチャー企業も日本で5~6社設立されるようになり、順調に実績を伸ばしている。DLCの工業分野への応用例は、多くのコンピュータのハードディスクに使用されている。ハードディスクに数十ナノメートルのDLC薄膜を被覆することにより高速回転・停止・高速回転の摩擦に耐えることができる。また、DLC膜は優れたガスバリア特性を有することが確認されており、PETボトルの内面に被覆し、酸素の外部からの浸入および炭酸の外部への拡散を防止する開発も実用化寸前まで進んでいる。このようにDLC膜は炭素から構成され、優れた機械的特性および化学的特性を有することは幅広く知られている。また近年では、DLCの優れた特性を医療に応用することが注目されつつある。

また我々は、更なる膜の軟性化と密着性を改良するために、DLC膜をベースに高度変形部分でも追従するフッ素添加DLC(以下、F-DLC)の独自の開発をはじめている。F-DLCは、DLC膜生成の際にメタンガスあるいはアセチレンガスにフッ素ガスを添加混合し成膜化学蒸着法:CVD法)することで合成できる非晶質フッ素添加炭素膜であり、40~50nm程度のナノオーダーでの薄膜形成が可能となっている。DLCにフッ素を添加することでDLC膜の応力は下がりさらに軟性化する。基材との密着性を充分に得るためF-DLCにも中間層を設けはく離の問題にも対応できるように改良した。さらに我々は、F-DLCの優れた生体適合性²⁾および抗血栓性³⁾を示し、F-DLCあるいはDLC膜を医療材料に被覆し応用する試み⁴⁾を始めており、多くの成果を上げている。詳

細については、以下の4.6項にても概説する。

以下、主に心血管病変に対する治療デバイスとDLCに関する我々の研究成果について報告およびその展望について報告する。

4. 1 我が国における心血管疾患の現状と治療

近年我が国では、高齢化および食生活の急激な変化により、いわゆる「成人病」(生活習慣病)患者が急増している。継続的な肥満、高血圧、高脂血症は、全身の血管病変発症を促し、重大な健康障害を引き起こす。わが国では単独の死因としては、悪性新生物が31.0%と最大の死因となっているが、循環器系および脳血管系を併せた血管系病変による死因は、悪性新生物による死亡率を上回る最大の死因となり、現在の医療の現場において非常に重大な課題となっている。

血管病変、特に高脂血症・動脈硬化によって引き起こされる疾患の治療法としては、初期の段階では食事療法や抗高脂血症薬が選択される。しかし一度狭くなってしまった血管や、逆に拡張しすぎた血管については自然回復を期待することは非常に困難であるために、病変血管を切除し、「人工血管」に置換する方法、つまり外科的治療=手術が選択される。また、近年の医療技術の発達により、人体にとってさらに非侵襲的な「血管内治療」が普及してきている。血管内治療においては、足の付け根部分の大腿動脈あるいは腕の動脈を注射針により穿刺し、ガイドワイヤーを用いて、小切開によって開けた穴から柔軟なチューブ状の手術器具である細いカテーテルを血管の内部に挿入し、造影剤を用いて放射線透視下で診断・血管内治療を行う。狭窄血管に対しては、バルーン(風船)付きカテーテルを用い血管拡張術を行う、あるいは、それに引き続き「ステント」(図1)と呼ばれるトンネル状(金網状)の金属管を入れて、再び血流を確保する。この治療は局所麻酔のみで行われるが、高度な熟練技術を必要とする。しかし通常の全身麻酔下での手術に比して患者負担が軽減されるため、世界中で広く普及しており、術式・手技の改善改

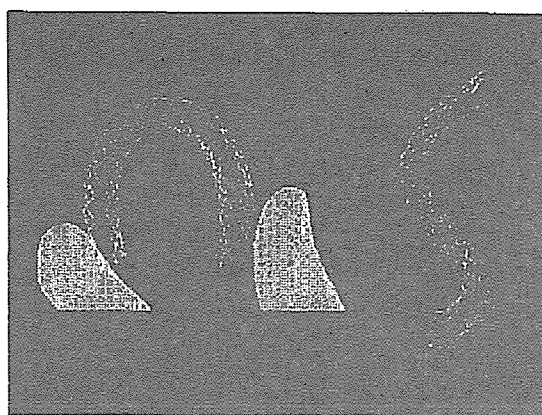


図1 自己拡張型金属ステントの一例

血管内金属ステントは、主に心筋梗塞および狭心症にともなう冠動脈閉塞・狭窄病変、閉塞性動脈硬化症にともなう腎動脈や下肢動脈の閉塞・狭窄病変を患者の負担を少なくして治療する治療機具である。バルーンカテーテル(風船付の管)と併用して使用されることもありうる。本ステントはNi-Ti合金でできており自己拡張性と柔軟性を有する。

良のみならず、ステント自体の研究も行われている。

特に現在までのステント開発の方向性は、他の人工臓器の開発と同様、まずは「いかに機能(=血管内での拡張力)を保つか?」という点を中心として、主にそのデザインの開発に主眼がおかれてきた。しかしながら、高齢化社会が加速し、長期留置成績の向上が求められる現代においては、いかに長期間、異物としての反応を軽減するか、つまり「生体適応性、耐久性」という点に重点をおいた開発が再度求められるようになってきている。現在、開発の中心はステント全体としての機能性という点に着眼するところから、ステントが血管内腔の細胞と接触する「界面機能」の追求へと主眼が変化している過渡期といえる。こういった流れの中で、細胞・分子レベルで効果を発揮する薬剤との組み合わせや、近年実用レベルまでに昇華しつつあるナノテクノロジーを応用したステント表面改質の展開が予想される。

以下、心血管疾患の治療に使われる人工血管およびステントの現状について解説し、表面改質への取り組みと、カーボン素材やダイヤモンドナノテクノロジーの関与について述べる。

4. 2 人工血管

人工の血管(人工血管)は成人では主に病的な生体血管を取り替え、バイパスあるいはシャントする目的に使用される。1952年、Voorheesが世界で初めて人工物を縫いつけて血管の代用にする動物実験に成功した。人工血管置換術は、狭窄あるいは閉塞してしまった元々の血管の代用品として人工物に取り替えるあるいは、新たに埋め込むという単純明快なコンセプトであるが、人工血管は、長期体内埋め込み材料であり、生体適応性・耐久性が重視される。現在用いられている人工血管の主な材料は布(ダクロンなど)、高分子材料(PTFE)あるいは、生体材料由来で、病変部位と材料特性に応じて使い分けられている。医療現場において人工血管は、大型(中一動脈)レベルでは満足できる治療成績を上げているが、6 mm以下の細い動脈では自己動脈と同等、もしくはそれ以上の治療効果をあげているものは残念ながら、まだ無い。これは、細径の血管では血流がより遅延しやすく、内腔の抗血栓性も不十分な結果といえるだろう。新規開発の余地が残る分野である。

また、近年、ステントグラフト(図2)と呼ばれる、これら人工血管にさらに金属の支えを併用したタイプの人工血管も開発され、主に大動脈瘤の治療に効果を上げている。しかし我が国では、ステントグラフトによる大動脈瘤治療は近年、健康保険適応が認められたものの、実際に国内で認可されているデバイス(製品)が存在しない、という大きな矛盾が存在している。そのため使用するデバイスは、海外からの個人輸入あるいは国内でホーム・メイドに近い形で作製、各施設の倫理委員会承認をうけて使用しているのが現実である。筆者らは、(長谷部ら：慶應義塾大学病院放射線診断科；栗林幸夫教授)国内開発型の「ホーム・メイドタイプのステントグラフト」や「井上ステントグラフト(図2)」を用いて大動脈瘤は治療の前臨床試験を行った経験があり有用性を報告しているが^{9)~7)}、その安全性、耐久性についてはまだ確定しておらず、国内における研究・臨床開発が急務である。

4. 3 ステント開発の現状

前述の人工血管は主に比較的大きな血管病変の治療に使用されることが多いが、ステントの治療対象部位は主に内腔数ミリメートル大の狭小な血管である。代表的には、心筋梗塞や、狭心症の治療に用いられている。金属ステント留置は人工血管と異なり放射線透視下での血管内手術(血管造影の診断技術を応用した治療：Intervention)で施行可能である。実施者の高度な技術を必要とするも、局所麻酔下で施行可能あり、患者に与える身体的な侵襲は全身麻酔下と比べて低い。そのため、入院期間の短縮や患者QOL(quality of life)の上昇に大きく貢献する。しかしながら、ステントの初期血管開存率は非常に良い成績を示すものの、中〜長期時期におこる血管の再狭窄が大きな問題となる。これは、金属ステントそのものが「異物」として血管内に残ることに対する生体の過剰反応に他ならない。ステント周囲においては最初に、血栓形成が起こり、それを引き金として血管平滑筋細胞の増殖・遊走、血管内膜の過剰な新生が起こってくる。そして再びステントの内腔が狭窄してしまう。そのため、血液や血管と接触するステントの表面材質の加工、改善が重要になってくるのである。

4. 4 ステント素材と表面改質：生体適応性の向上に求められる条件

ステント留置後の再狭窄防止法として、さまざまな局所および経静脈的な薬物投与(遺伝子治療等を含む)の試みがなされてきているが、いまだ最適な薬物が確定されていない。ステント留置の問題点の根本は、前述したようにステント周囲の異物反応と血栓化が最初のステップとして挙げられる。現在、臨床利用可能な一般的なステント基材は、ステンレススチール(SUS316L)あるいはナイチノール合金である。ナイチノールは、ニッケル・チタンからなる合金で、超弾性形状記憶合金として近年使用されてきている。SUS316Lはそ

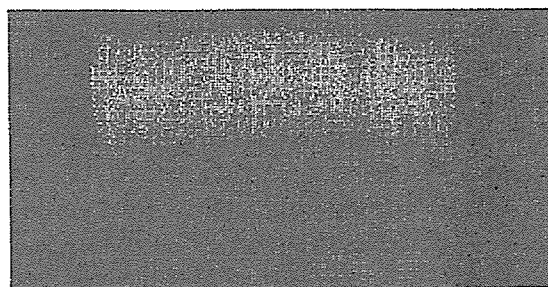


図2 ステントグラフトの一例(井上式ステントグラフト)

人工血管(ダクロン製)の内部にリング状のワイヤーが包埋されており自己拡張力を要する。開腹手術することなしに、足の付け根の動脈(大腿動脈)から器具血管内に挿入し、ステントグラフトを患部に留置することにより大動脈瘤を治療することができる。本ステントグラフトは、血管内手術前に行われるCTスキャン検査にて患者さんの血管径の詳細を測定し、特殊なソフトによってオーダーメイドされたストレートタイプの井上式ステントグラフトである。人工血管内部は抗血栓性が求められ、人工血管の外側は血管としっかりと密着し生着することが求められる。コーティングなど、内部と外部の表面加工を変えることによりニーズに応えられる可能性がある。

れ自体、抗血栓性と生体適合性に優れた金属系バイオマテリアルといわれているが、さらなる抗血栓性の向上、生体適合性の向上が臨床上の再狭窄の問題点を解決する糸口となりうるため、世界の研究者の間でさまざまな開発競争が進んでいる。

ステント用金属材料表面の改良、改質のためにさまざまな金属表面へのコーティングが試されている。コーティング材料には、生体物質、生体類似物質、高分子材料、金属材料、無機材料などがある。生体物質や生体類似物質のコーティングとして、ヘパリン、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸、フィブリン、ホスホリルコリンなどがある。高分子材料のコーティングとして先に述べた、ポリエチレンテレフタレート(PET)、ポリウレタン(PU)、セグメント化ポリウレタン(SPU)、シリコン、ポリ乳酸(PLA)、ポリカプロラクトン、セルロース等が挙げられる⁹⁾。金属や無機材料系のコーティングとして金が、炭素系コーティング材としてグラファイト、シリコンカーバイド(Si-C)などがありステント用コーティング材に試みられている⁹⁾。我々が注目している炭素系素材である DLC もこのカテゴリーに属する。

これらコーティング材の有用性が示される一方で、その問題点も指摘されている。生体物質や生体類似物質のコーティング材の場合、基材とスペーサーの結合力の弱さ(特にイオン結合の場合に問題となる)から起こる、コーティング材脱落の可能性が考えられる。高分子系コーティング材の場合、基材との密着強度の低さに起因するはく離とコーティング方法に起因する厚みの問題、そして体内での変性劣化、炎症反応の誘発などの問題がある。そして金属や炭素系コーティング材の場合にも、基材との密着力の低さに起因するはく離と、高い膜の応力に起因するクラックの発生や炎症反応の誘発などの問題がある。材料の評価も問題で、材料評価項目には、抗血栓性評価、免疫補体反応そして炎症反応の評価があり、*in vivo*での生体反応を予測する上で単独評価するのではなく同時に評価することが必要であると考えている。バイオマテリアル全般に言えることだが、抗血栓性に優れた材料が必ずしも生体適合性には優れない場合もあり、体内に埋め込まれるインプラント材に抗血栓性、生体適応性の両面からの評価が必要である。コーティング材と血管内組織の間で起こる生体反応は、抗血栓性に優れなくとも血管内皮との親和性の高い材料が組織親和性の高い材料であれば、早期に被覆が完成し恒久的抗血栓性が獲得される。内膜被覆完成までの血栓形成期間は重要で、材料表面で形成される微小血栓による血栓症や血管内血栓閉塞、そして血栓沈着による内膜の過形成が誘発される可能性がある。特に血管内埋め込み医療器具表面は、抗血栓性と生体適合性の両者に優れなければならず、詳細な評価が必要となる。

次に、冠動脈ステント用コーティング材の物理的条件について考える。治療対象部位の血管径は狭小であるため、ステント用コーティング材には良好な通過性をもとめられ、薄く滑りやすくはく離しないなどの物理的条件が要求される。コーティング材が大きな摩擦抵抗を持ち、厚い膜であると治療対象部位での通過性が劣ることで血管損傷も惹起され、基材からはく離の可能性も高くなる。加えてはく離の問題は、

すべてのコーティング材が持つ解決しなければならない問題である。ステントは、その拡張時には主要な変形部分であるストラット頂点での変形は大きく、コーティング材にとって過酷な条件となる。最近、多くのステント用コーティング材が、はく離やコーティングむらを起こすことが指摘されている。これは基材との密着性が低いことや膜応力が高いためであると考えられる。DLCにおいては、シリコンやシリコンカーバイドを中間層として選択することにより密着性が向上することが示唆されている^{9),10)}。また、DLC膜に他の元素を添加することによって(フッ素⁹⁾やシリコン⁹⁾など)、従来のDLCよりも膜が柔軟でかつ内部応力の低い薄膜を作製することによって基板への追従性が向上する。コーティング材のはく離の問題は、重要な関心事であり早期に改善されなければならない。

4. 5 抗血栓性コーティングに関する行政からの通達について—無機物を用いた開発の重要性—

近年、行政面からも、動物由来の医療材料の安全性については、特に厳しい基準が指導されている。たとえば、カテーテルの抗血栓性を保つためのヘパリンコーティングも、動物由来であり、その長期的な安全性の確保という点で疑問が残るため(未知のウイルスや免疫への影響など)、今後の方向としてはできるだけ別のものに代替することが望まれている。現実的に、病院臨床の場においても、いくつかの血管内手術をする上で重要な医療器具や体内留置用カテーテルの発売中止例があり、治療をする上で患者様の不利益となりかねない状況に直面することがあり、代替品の開発は急務である。

上記で述べた DLC は炭素と水素(人体の構成成分)で構成されており、体にもよりやさしい材料となっている。もちろん、上記の人工血管やステント以外のあらゆる医療器具や人工臓器などへのコーティングが可能と考えられる。加えてコーティングとして用いた場合、その高いバリア性能は、基材からの有害物質の溶出やイオンの溶出を防止できる可能性が高い。実際に輸血のラインや血液チューブなどの医療用具で用いられているポリ塩化ビニル樹脂については、優れた柔軟性を保持するために材質中に可塑剤が添加されているが、材質が接触する溶媒中に可塑剤(DEHP: フタル酸ジ-2-エチルヘキシル)が溶出してくることが知られている。DEHP は主として精巣毒性を有する一般毒性物質であることから、耐容一日摂取量が設定されている。医薬品・医療用具等安全性情報 182 号(厚生労働省医薬局 平成 14 年 10 月)により医療関係者等への情報提供と医療用具メーカーへの指示が出ており、DEHP を使用しない代替品開発が急がれる。

4. 6 カーボンナノテクノロジーの医療応用と展望

以上述べたように、血管病変の治療に対して用いられている人工血管や、ステントを長期にわたり体内に埋め込ませて使用させるためには、さらなる生体適合性、抗血栓性の向上が重要な課題となる。

現在ステントの分野では、「薬剤溶出性ステント」と呼ばれるステントが登場し、冠動脈ステント留置後の短期的な(一部、中期)再狭窄率は飛躍的に改善している¹¹⁾。しかしながら、薬剤溶出性ステントはステンレススチールやナイチンール素材の上に直接ポリマーをコーティングし、そこに薬

剤を含浸させる、という非常に単純な技術を使っている。つまり、依然として元のステント基材や薬剤の溶出を終えたポリマーは血管内に「異物」として存在しつづける。こういったことが、晩期の血栓性閉塞などを助長するという報告もでてきている。また、細径の下肢動脈(浅大腿動脈など)の領域においては、薬剤溶出性ステントを用いてもよい成績が得られないことが大規模臨床試験にてわかっている。

我々は、従来工業分野で優れた摺動特性(低摩擦係数)と耐摩擦性を併せ持つ材料として注目されてきている炭素系の新しい素材、DLC に注目し、ステントへの応用を試み、国際学会にて報告してきた^{12)~14)}(図3)。炭素系薄膜である DLC は生体適合性に優れることが証明されており、抗血栓性に優れるならステント用コーティング材として有望であると判断した。かつて DLC は、硬質基材に限られるハードコーティングであったが、近年ではその改良が進み基材の変形にも追従する軟性化 DLC が開発されるようになり、その医用応用も広がる可能性が出てきた。我々研究グループは、この軟性化した DLC をステント上に成膜することに成功し、ステント用コーティング材としての評価を行った。この改良型 DLC を *in vitro* の抗血栓性評価を行ったところ、ステント基材 SUS 316 L の抗血栓性を血小板系・凝固系の両系統を有意に改善することがわかった。この DLC をステントに応用することで、基材表面を抗血栓性界面に改質できる可能性が示唆された。また、我々の一連の生体適合性評価実験より、抗血栓性および生体適合性に優れることが実証された^{23,24)}。

前述したとおり、我々は、更なる膜の軟性化と密着性を改良するために、DLC ベースに高度変形部分でも追従するフッ素添加 DLC (F-DLC) の独自の開発をはじめている。F-DLC は、原料ガスとしてメタンガスあるいはアセチレンガスにフロンガスを添加し、真空中にて rf (高周波) プラズマ

真空化学蒸着法 (rf-CVD 法) を用いて基板へのコーティングを行う。DLC にフッ素を添加成膜することで DLC 膜の応力は下がりさらに軟性化するため、基板への追従性が向上すると考えられる。我々の実験においては、全体のガスに対するフロンガスの分圧比を 20%~60% と変化させ、さまざまな F-DLC の成膜を行った²⁵⁾。成膜後 XPS で測定すると、実際は、膜内のフッ素含有量は約 10% 以下と少ない割合であったが、膜最表面に分布していることが証明された^{15), 16)}。さらに基板への膜の追従性を高め、基板の性質を損なわないために 40~50 nm 程度のナノオーダーでの薄膜形成が可能となっている。我々のグループでは初期実験として、F-DLC の *in vitro* の抗血栓性試験を行ったところ、従来の DLC を上回る成績が認められた^{23,24), 15), 16)}(図4)。F-DLC の bioengineering の分野におけるインパクトはその応用性の広さを考えると非常に大きなものになるものと思われる。

ダイヤモンドテクノロジーは医療分野においても非常に魅力的な素材であり、日本はこの分野で世界最高峰の研究水準にある。また、ナノテクノロジーの技術を用い、さらに薄いコーティングの作製、あるいは医療材料の界面そのものの表面改質を施すことによって、より優れたデバイスの開発が可能であると考えられる。

4. 7 海外における DLC の医療応用と開発状況

医療材料は、その需要が国内で年々高まっているにも関わらず、平均して 80% が輸入に頼っているのが現状で、特に人工関節やカテーテルのような体内埋め込み部材や体内挿入部材については大半が輸入に頼っている。輸入超過の状態が続いている。世界最高水準の技術力を持ち、安定した医療が受けられるわが国であるにもかかわらず、人工血管やステントに関してはその大半を輸入に頼っているのでは、健康を守る我々臨床医の観点からみれば、非常に許しがたい状況にあ

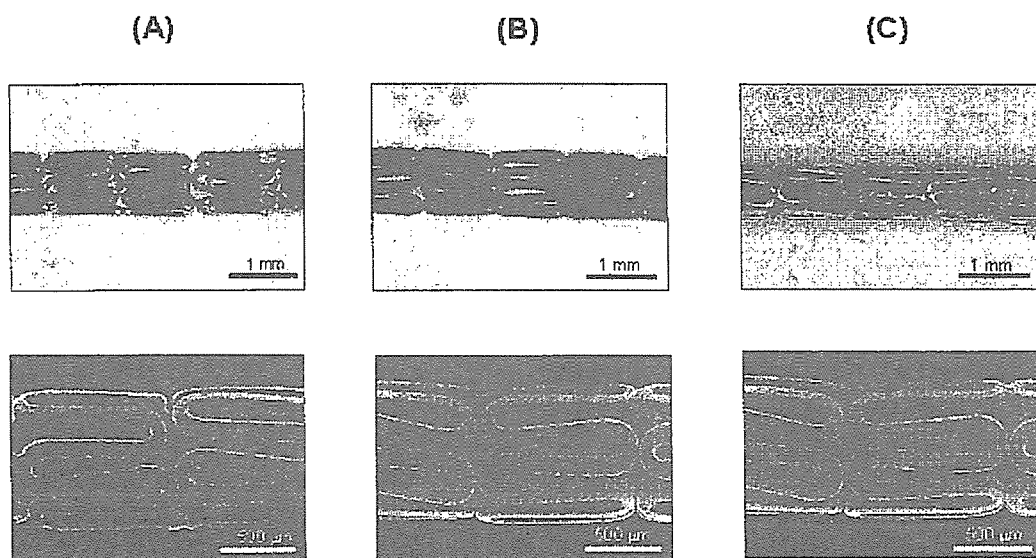


図3 金属ステントへの DLC および F-DLC コーティングの試み

市販の金属ステント表面上に、化学蒸着法により DLC あるいは F-DLC を用いた抗血栓性コーティングを試みた。耐久性などについては、さらなる検討が必要であるが、本図においては明らかな DLC および F-DLC コーティング像にはく離はない。A: コーティングなしステント, B: DLC コーティングステント, C: F-DLC コーティングステント (上段: マクロ像, 下段: SEM 像)

るといえる。

日本が得意とするナノテクノロジー分野と医療機器分野との融合から、最終的には新しい日本初の医療機器を開発する必要がある。そのためには、抗血栓性を客観的に評価することが不可欠である。抗血栓性評価は、血液に接触する医療機器を開発するポイントであるが、その方法は日本国内でも海外においても、各機関がそれぞれの方法で、それぞれの評価を下しているのが現状である。したがって、各機関から発表されたデータを異なる機関で再現することは不可能で、結果として学術論文自体の信頼度およびそのデータを用いた医療機器開発の助けとなっていない。今年3月、日本産業振興協会の依頼でヨーロッパの先駆的な論文を発表しているヨーロッパの3機関を訪ね、「DLCの医療機器への応用」に関する調査を実施した(鈴木および長谷部)。

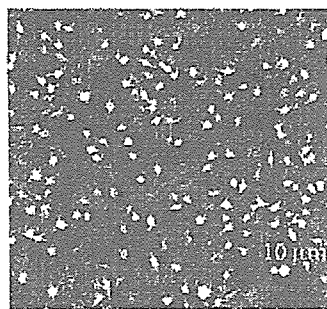
4. 7. 1 University of Nottingham

University of Nottingham はロンドン中心部から、北へ約3時間列車かかり、町は古いイギリスの田舎町である。ヨーロッパには、「European union」という考えが濃く、事実ユニオンが多額の予算を握っており、国と国との連携も強い。D. M. Grant 教授も、ヨーロッパの学会を飛び回る感じで、米国やアジアを(遠いということもあるが)あまり訪れな

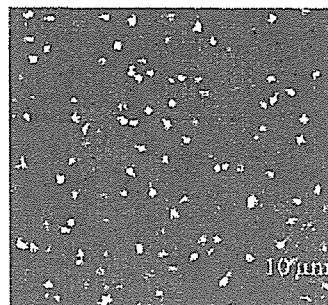
い。大型プロジェクトの予算は日本でいう財務省が握っており、(日本でいう)経済産業省が産業推進の目的で管理し、厚生労働省と協力して実施するとのことである。日本に比べて規制が緩いので省庁間の連携も上手くいっているのかもしれない。チューブの内面コーティングの需要が極めて高く、開発する必要があるとのことだった。もちろん日本でも多くがトライしたことではあるが、良い成果は生まれていない。今後、医療機器関連の大きな需要を考えても進める必要がありかもしれない。ステントの素材はステンレスまたはNi-Ti合金であるが、コーティングして抗血栓性を向上させる以前に、表面粗度や加工傷の問題が重要である¹⁷⁾。特にNi-Ti合金の表面はNiが偏析しており、抗血栓性に悪影響があるとのことだった。このように金属イオンの溶出に対しても生体適合性が高く、バリア性が高いDLCコーティングは有用であると考えられる。

4. 7. 2 University of Ulster, Nanotechnology Research Institute

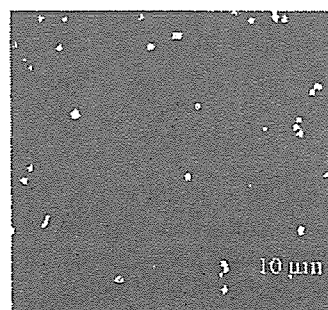
University of Ulster はベルファストの北約15 km にあり、美しい敷地に大きな建物が4~5棟建っている。Nanotechnology Research Institute は少々離れた場所にあり、デザインは米国風の研究所だった。J. A. McLaughlin 教授およ



シリコン基板



DLCコーティング



F-DLCコーティング

図4 血小板付着試験(シリコン基板, DLC, F-DLC)

シリコン基板(1×1 cm)にDLCおよびF-DLCをコーティング後、各サンプルを濃厚血小板液(PRP)に30分間浸漬した後、脱水・乾燥。その後、SEMにて血小板付着について観察した(各基板における代表的サンプルを示す)。シリコン基板には、多くの活性化された血小板(べったりとしてアメーバ状に足を伸ばしているもの)が付着している。DLCではシリコンよりやや付着数が少ない。F-DLCにおいては、著明に付着数が少なく、かつ活性化された血小板が少ない(活性化の弱い球状の血小板が多い)。F-DLCの有意な抗血栓性が示唆される。

び P. Maguire 教授が研究チームを率いている。

金属ステントの DLC コーティングおよび実用化には極めて積極的で、法律的にも抗血栓性・デザイン・コスト・治具に至る細かい点まで詳細に認識していた。DLC の医療応用に関しては、特に Si 添加 DLC をメインテーマとして研究しており、我々の F-DLC と同様に良好な抗血栓性を報告している^{9),10)}。Medical application がグループのメインテーマであるが、カーボンナノチューブ、ペットボトルの内側コーティング、大気圧プラズマ技術およびナノパターンニングなども実施していた。このグループの特徴は、University of Nottingham よりも、他分野の研究者を 1 つのグループ内に集めていることだ。材料科学、プラズマ技術者、解析者、化学者、医師、経営学者等の集団で、意識的にそうしている。Queens University と共同で、「NanoTec」という会社を設立し、多くの企業と連携してベルファスト近郊の産業の復興に努めていた。北アイルランドはここ 10 年、経済が好調で科学技術に多額を投資しており、その一貫としてこのグループができ上がってきたようである。施設は極めて綺麗で、最新装置が広いスペースにゆったりと置いてある。国からの支援だけでなく企業との連携も多く、特にボストンサイエンティフィックやメドトロニックのような大手医療機器会社と共同開発を実施していた。日本のテルモの研究開発状況も良く知っており、「医療機器の実用化」という観点からは本施設は世界的にも群を抜いていると考えられる。

4. 7. 3 スイス連邦材料試験研究所 (EMPA) : Laboratory for Nanoscale Materials Science

EMPA はチューリッヒの郊外にあり、スタッフを含め研究員総数は約 500 人という大きな国立研究所である。我々は、DLC のいくつかの総説¹⁰⁾を発表している R. Hauert 博士 (Head of Surface Technology) および EMPA の施設長の L. Schlappach 教授を訪問した。スイスというお国柄からか、時計部品(歯車)への DLC コーティングの実用化の話は意味深であった。高級時計は、オイルで摺動を制御するが、それは 20 年間の保障であるらしい。したがって 20 年くらいたつと寿命ということになる。DLC は半永久的ということで実用化されている。ただし、まだ 20 年経っていないので結果は出ていない。また時計バンドでも、金属アレルギーを防ぐ目的で DLC コーティングは実用化されている。血液循環ポンプや心臓弁への応用例も多くあるらしいが、実用化されているかは不明である。たとえばイタリアの医療機器大手のソーリン (SORIN) は DLC に関連した医療機器を数種製品化しているらしい。「開発から製品化」への議論になったが、スイスの場合 “Swiss federal office of public research” が監督して、規則は米国の FDA (Food and Drug Administration: 食品医薬品局) に比べゆるいらしい。製品をワールドワイドに展開する場合は FDA の認可も取得しなければならない。全体として、医療機器の種類によりケースバイケースだが、まず新開発品をヨーロッパで製品化し、様子を見ながら世界展開できるところに彼らの強みがあると感じた。

5. おわりに

全体として、今後表面改質を利用して新しい医療機器を世

界に発信するに当たり、以下の点が重要と考えた。

- 1) 外国製品は外国人の体型・体質に即していることが多々あり、日本人に合わない場合がある(たとえば、血管径は欧米人より日本人の方が小さい場合が多く、器具を導入する際に血管径に対して器具が太すぎる・・・など)。製品が日本人に適さないと判断できるのは日本の病院で患者に使用される段階になってからである。日本人のために新たな改良を欧米の日本販売代理店に陳情したとしても、本国との連絡には時間がかかるばかりでなく、欧米企業は医療業界においても常に「マーケット」という考えが強くあるため、欧米のニーズを最優先し、多大な費用がかかる変更には消極的な場合も多く見受けられる(変更には数年単位かかることもありうる)。これらの事態は、患者様の利益という点においても、国民の健康を守っていく医師の立場からみても由々しき事態であり、安全保障上の理由からも純日本製の製品の開発・販売の促進が重要である。これは、現在資金力のないが技術力をもった中小企業を育成し、医療器具開発・販売メーカーの層を厚くすることが急務である。
- 2) 日本独自の技術(日本人の器用さ)で西欧技術を凌駕するような製品を突き詰めるべきである。たとえば、金属ステントのデザインなどにも我が国固有の西陣織のような技術が適応できる可能性がある。
- 3) 新規の製品開発だけを狙うのではなく、従来の日本型開発方法を模倣した修正型開発方式は適用することも重要なステップとなりうる。

以上の点を実現するためのチームとして、臨床医、工学・理学博士、国内企業、各省庁など、各分野のエキスパートが密な研究協力体性をとることが必要である。このようなチームは形式上、近年実現されつつあるが、実情は厳しく、本当の意味でも連携ができているプロジェクトは少ないといつてよい。患者様のニーズを正確に把握し、実際の臨床現場で必要とされている日本国内発信型のメディカルデバイスを開発、実用応用につなげていきたいと考えている。

(2005-9-6 受理)

文 献

- 1) S. Yamamoto, H. Kodama, T. Hasebe and A. Shirakura; *Diamond Relat. Mater.*, 14, 1112 (2005)
- 2) T. Hasebe, A. Shimada, T. Suzuki, Y. Matsuoka, T. Saito, S. Yohena, A. Kamijo, N. Siraga, M. Higuchi, K. Kimura, H. Yoshimura and S. Kuribayashi; *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, (2005) (in press) (available online, Sep. 1)
- 3) T. Saito*, T. Hasebe*, S. Yohena, Y. Matsuoka, A. Kamijo, K. Takahashi and T. Suzuki; *Diamond Relat. Mater.*, 14, 1116 (2005) (*T. Saito and T. Hasebe: equal contribution)
- 4) T. Hasebe, Y. Matsuoka, H. Kadama, T. Saito, S. Yohena, A. Kamijo, N. Shiraga, M. Higuchi, S. Kuribayashi and K. Takahashi, T. Suzuki; *Diamond Relat. Mater.*, (2005) (in press) (available online, Sep. 12)
- 5) 松本一宏, 橋本 統, 大杉 圭, 曾我茂義, 長谷部光泉, 中塚誠之, 栗林幸夫, 井上寛治; 日本医学放射線学会雑誌, 64, (2), S111 (2004)
- 6) 杉浦弘明, 橋本 統, 栗林幸夫, 磯貝 豪, 佐藤真康, 長谷部光泉, 松本一宏, 中塚誠之, 井上寛治; *Interventional Radiology*,

- 18(Suppl.), 56 (2003)
- 7) 長谷部光泉, 橋本 統, 中塚誠之, 松本一宏, 栗林幸夫, 井上寛治, 小泉 淳; *Interventional Radiology*, 18(Suppl.), 54 (2003)
- 8) 長谷部光泉, 島田 厚, 橋本 統, 中塚誠之, 松本一宏, 吉村博邦, 栗林幸夫; *Interventional Radiology*, 17, (2), 102 (2002)
- 9) P. D. Maguire, J. A. McLaughlin, T. I. T. Okpalugo, P. Lemoine, P. Papakonstantinou, E. T. McAdams, M. Needham, A. A. Ogwu, M. Ball and G. A. Abbas; *Diamond Relat. Mater.*, 14, 1277 (2005)
- 10) J. A. McLaughlin, B. Meenan, P. Maguire and N. Jamieson; *Diamond Relat. Mater.*, 5, 486 (1996)
- 11) 長谷部光泉, 島田 厚, 鈴木哲也, 白神伸之, 樋口 睦, 石橋了知, 松岡義明, 齊藤俊哉, 饒平名智士, 吉村博邦, 栗林幸夫; *臨床放射線*, 49, (13), 1771 (2004)
- 12) T. Hasebe, A. Shimada, K. Kimura, H. Yoshimura, K. Kandarpa and S. Kuribayashi; Radiological Society of North America (RSNA) 2002, p. 711 (*Radiology (Supple.)*, 221 (p) (2001))
- 13) T. Hasebe, A. Shimada, K. Kimura, H. Obara, H. Yoshimura, K. Kandarpa and S. Kuribayashi; Radiological Society of North America (RSNA) 2001, p. 131 (*Radiology (Supple.)*, 217 (p) (2000))
- 14) T. Hasebe; The 8th International Symposium on Interventional Radiology & Vascular Imaging cooperated with The 31st Annual Meeting of the Japanese Society of Angiography & Interventional Radiology, Tokyo, Japan, p. 1 (*Cardiovasc Intervent Radiol (Supple.)*, 25 (2002))
- 15) 饒平名智士, 長谷部光泉, 齊藤俊哉, 松岡義明, 上條亜紀, 高橋孝喜, 鈴木哲也; 第18回ダイヤモンドシンポジウム(つくば市), p. 128(ダイヤモンドシンポジウム講演要旨集 Vol. 18th, (2004))
- 16) 齊藤俊哉, 長谷部光泉, 饒平名智士, 松岡義明, 上條亜紀, 高橋孝喜, 鈴木哲也; 第18回ダイヤモンドシンポジウム(つくば市), p. 32(ダイヤモンドシンポジウム講演要旨集 Vol. 18th, (2004))
- 17) D. A. Armitage, T. L. Parker and D. M. Grant; *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, 66, 129 (2003)
- 18) R. Hauert; *Diamond Relat. Mater.*, 12, 583 (2003)
- ~~~~~

Lubrication performance of diamond-like carbon and fluorinated diamond-like carbon coatings for intravascular guidewires

T. Hasebe^{a,b,*}, Y. Matsuoka^a, H. Kodama^a, T. Saito^a, S. Yohena^a, A. Kamijo^c, N. Shiraga^b,
M. Higuchi^b, S. Kuribayashi^d, K. Takahashi^c, T. Suzuki^a

^a Center for Materials Science, Department of Mechanical Engineering, Keio University Faculty of Science and Technology,
3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522, Japan

^b Department of Radiology, Tachikawa Hospital, 4-2-22 Nishiki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-8531, Japan

^c Department of Transfusion Medicine, The University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

^d Department of Diagnostic Radiology, Keio University School of Medicine, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

Received 20 April 2005; received in revised form 21 July 2005; accepted 6 August 2005

Available online 12 September 2005

Abstract

Diamond-like carbon (DLC) and fluorinated DLC (F-DLC) films were deposited on SUS316L guidewires using radio frequency (RF) plasma enhanced chemical vapor deposition (CVD), and the lubrication performance of DLC- or F-DLC-coated guidewires was then evaluated under in vitro conditions using a novel friction simulator developed for this study. Scanning electron microscopy (SEM) demonstrated that DLC or F-DLC film completely coated the specimens (SUS316L guidewires) and that polishing scars were substantially reduced. In the tortuous vessel model, DLC- or F-DLC-coated guidewires exhibited significantly improved lubrication performance (by approximately 30% over that of uncoated wires). DLC and F-DLC films are thus promising candidates for lubricious coating of intravascular guidewires.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Diamond-like carbon; Fluorinated diamond-like carbon; Lubrication; Guidewire

1. Introduction

Intravascular guidewires are widely utilized to guide and place catheters for diagnostic angiography and balloon catheters for percutaneous transluminal angioplasty (PTA) in the vascular lumens of human body. For example, to perform diagnostic angiography followed by therapeutic intervention in the human vascular system, a guidewire is first inserted into the vessel and guided through the tortuous path desired for the catheter, after which the catheter is threaded over the guidewire. As the catheter is inserted and advanced over the guidewire, it ultimately negotiates the same tortuous path. However, the inability to pass the guidewire through tight stenoses or tortuous vessels is the most common cause of

failed angioplasty. Thus, the lubrication performance of guidewires is critical for successful procedures.

After the catheter is placed in its final operative position, the diagnostic guidewire can be removed and the catheter is used to perform angiography with contrast material; however, guidewires for PTA and stent placement usually remain in the target vessels throughout the entire procedure. Because the duration of many of these interventional procedures is relatively long, the possibility of thrombotic embolus formation on the guidewire surface increases the risk of downstream occlusion in the coronary, cerebral, and femoropopliteal regions. Therefore, the distal part of an intravascular guidewire should be not only flexible, nonkinking, radiopaque and lubricious, but also antithrombogenic.

Hydrophilic coatings have a relatively recent advance in commercial catheter and guidewire technology. Hydrophilic catheters and guidewires facilitate difficult catheterization, particularly for therapeutic interventional procedures in which extremely distal access is required [1]. This type of coating is believed to be sufficiently lubricious for catheterization and to

* Corresponding author. Center for Materials Science (Tetsuya Suzuki lab.), Department of Mechanical Engineering, Keio University Faculty of Science and Technology, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku Yokohama, Kanagawa 223-8522, Japan. Tel.: +81 45 563 1141; fax: +81 45 566 1495.

E-mail address: teru_hasebe@hotmail.com (T. Hasebe).

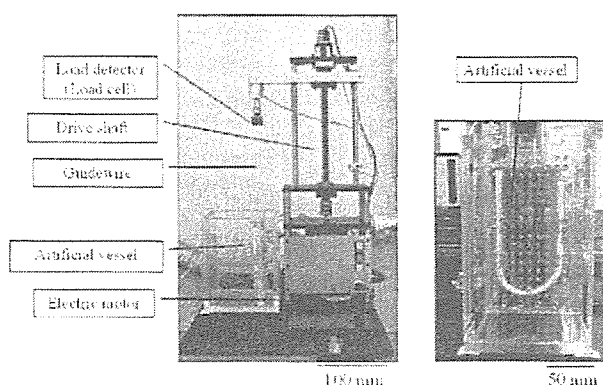


Fig. 1. Friction simulator for guidewires consisting of a fixed frame with a drive shaft linked to an electric motor, a load cell, a guidewire and an artificial vessel (PTFE; 6 mm i.d.). The artificial vessel was set in an acrylic resin tub in order to facilitate simple changes in shape.

reduce damage to the vessel wall during advancing and retraction based on the clinical experience that such coatings facilitate the penetration of stenoses. However, Leach et al. [2] reported that hydrophilic coatings were at least as thrombogenic as uncoated nonhydrophilic materials. This supports our observation of clotted blood on hydrophilic guidewires after use and our difficulties in inserting guidewires into angiographic catheters placed in the target vessel unless the guidewire is first wiped with a piece of gauze dipped in heparinized saline. On the other hand, guidewires are sometimes coated with polytetrafluoroethylene (PTFE) or silicon overlays as the hydrophobic coating. However, these coatings also have problems of thrombus formation in a clinical setting.

Diamond-like carbon (DLC) films are dense amorphous carbon films characterized by their hardness, wear resistance, electrical resistance and chemical inertness [3,4]. The mechanical properties of these films fall between those of graphite and diamond; the films have a low-friction coefficient, low wear rate, high hardness, excellent tribological properties and good corrosion resistance [5,6]. In addition, a number of promising results have indicated good blood compatibility, antithrombogenicity and biocompatibility in various cell culture [5,7–14] and animal models [11,15]. DLC coatings are therefore being considered for widespread clinical use as surface coatings for coronary stents [16–18], heart valves [19] and orthopedic implants [11] for humans. Application of DLC coatings to intravascular guidewires would therefore be rational because these coatings have advantageous tribological properties together with antithrombogenic characteristics.

Our previous study [20] confirmed a dramatic reduction in the number and activation of adhered platelets after doping conventional diamond-like carbon films with fluorine (F-DLC). In this investigation, we deposited DLC or F-DLC films on intravascular guidewires using the radio frequency (RF) plasma enhanced chemical vapor deposition (CVD) method and evaluated the lubrication performance of DLC- or F-DLC-coated guidewires under in vitro

conditions using a novel friction simulator developed for this study.

2. Experimental

DLC and F-DLC films were prepared by RF plasma enhanced CVD in a parallel plate reactor with hexafluoroethane (C_2F_6) and acetylene (C_2H_2) gas. DLC films were deposited from C_2H_2 and F-DLC films were from a mixture of C_2H_2 and C_2F_6 , respectively. F-DLC films were deposited under a partial pressure of C_2F_6 at 60% of the total pressure. The RF (13.56 MHz) power, total pressure and gas flow rate were fixed at 400 W, 13.3 Pa and 20 ml/min, respectively. Coatings were deposited to approximately 40 to 50 nm on SUS316L guidewires (0.4 mm i.d. \times 250 mm). Surfaces of uncoated SUS316L guidewires, DLC-coated guidewires and F-DLC-coated guidewires were observed by scanning electron microscopy (SEM).

We designed a friction simulator in order to evaluate the lubrication behavior of guidewires in vitro. The friction simulator consists of a fixed frame with a drive shaft linked to an electric motor, a load cell, a guidewire and an artificial vessel (polytetrafluoroethylene, PTFE; 6 mm i.d.), as shown in Fig. 1. Frictional forces were measured by the load cell while moving the guidewire up and down along the inner lumen of the artificial vessel at a velocity of 10 mm/s.

In this study, we tested uncoated, F-DLC- and DLC-coated guidewires in order to evaluate lubrication performance in two types of vascular setting, as shown in Fig. 2. Because it was difficult to reproduce the clinician's hand manipulation and to avoid bending the guidewire during insertion using the drive shaft, particularly in the tortuous vessel model (Fig. 2B), we collected and analyzed the maximum load (kgf) measured when the guidewire was retracted from the artificial vessel as lubrication performance data. Experiments were repeated 30 times with each guidewire in each vascular setting. The ratio of average maximum load for DLC- or F-DLC-coated guidewires to that for uncoated wires was calculated. Results are expressed as mean \pm standard deviation (SD). Data were compared

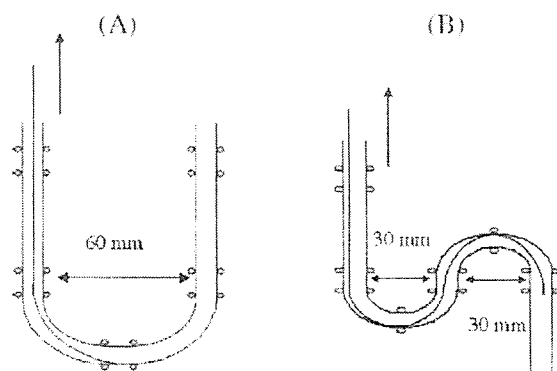


Fig. 2. Vascular conditions for assessing lubrication performance of guidewires: (A) Type-A artificial vessel model with a gentle curve; (B) Type-B artificial vessel model with a tortuous path.

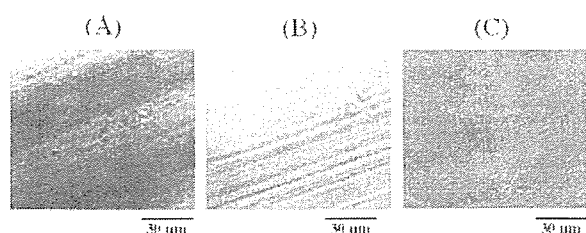


Fig. 3. SEM images of guidewire surfaces. (A) SUS316L, (B) DLC-coated, and (C) F-DLC-coated.

statistically by paired *t*-test and $P < 0.05$ was considered to be statistically significant.

3. Results and discussion

Fig. 3A is an SEM image showing the polishing scars on the surface of the SUS316L guidewire. The DLC and F-DLC films completely covered the specimens (SUS316L guidewires) and substantially reduced the appearance of polishing scars (Fig. 3B, C).

The average maximum load for DLC- or F-DLC-coated guidewires was compared to that of uncoated SUS316L guidewires under type-A (Fig. 2A) and type-B (Fig. 2B) vascular conditions. Fig. 4A and B show the lubrication performance data for DLC- or F-DLC-coated guidewires versus uncoated wires. Under type-A conditions, the lubricity of the DLC- or F-DLC-coated guidewires was almost the same as that of uncoated guidewires. There were no statistically significant differences between the DLC-coated, F-DLC-coated and uncoated groups. On the other hand, under type-B conditions, in which the vessel was more tortuous (Fig. 2B), the lubricity of the DLC- or F-DLC-coated guidewires was improved by approximately 30% over that of uncoated wires ($P < 0.05$). However, there was no statistically significant difference between the DLC and F-DLC groups. The friction drag against the inner wall of the artificial vessel under type-B conditions was thought to be higher than under type-A conditions, and thus the efficacy of DLC and F-DLC coatings was apparent in the more tortuous vessel model. This suggests that DLC- or F-DLC-coated guidewires would be able to more

easily navigate tortuous paths and pass through difficult regions within arteries in clinical settings. In contrast, the type-A artificial vessel has a relatively gentle curve with a large curvature, and the friction drag against its inner wall was thought to be low; therefore, lubrication performance was not enhanced by coating with DLC or F-DLC. In clinical settings, advancing a guidewire through arteries with gentle curves is relatively simple, irrespective of the guidewire used. Therefore, performance in tortuous vessels is more important for evaluating the lubricity of guidewires.

In lubricity tests, Maguire et al. [21] and McLaughlin et al. [22] found that the friction coefficient for conventional DLC coatings is better than that for PTFE coatings for guidewires. Finished catheters and guidewires are typically spray coated with a thin layer of PTFE, silicone overlays and other hydrophilic coatings, which reduce the friction coefficient. However, spraying does not produce coatings that are sufficiently smooth and uniform. Consistency is prized by designers whose task can be complicated by core material of varying diameter. Lubricious coatings have been used in a wide variety of medical devices, including those for use in cardiology, urology and neurology, and for many diagnostic applications. Angioplasty balloons, Foley catheters, urethral stents, microcatheters and guidewires all benefit from incorporation of lubricious coatings. Hemodialysis equipment is also coated to reduce patient trauma.

Our coating thickness is 40 to 50 nm in thickness, —much thinner than a conventional spray coating, which usually ranges from approximately 0.001 to 0.01 inches [in] (approximately 2.5×10^{-4} to 2.5×10^{-5} mm) [22]. This super-thin coating lets designers increase the diameter of the core material. For example, device specifications normally limit guidewire cores used in percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA) to a diameter of 0.014 in. To allow for the coating thickness, the specifications usually call for an uncoated wire diameter of 0.013 in. Coatings as thin as 40 to 50 nm can be achieved with minimal dimensional changes to the substrate. Furthermore, the coating thickness can be customized to meet manufacturers' specifications. Thus, designers can increase the size of the material to add stiffness when using DLC or F-DLC coatings, which is a key property of the PTCA guidewire core.

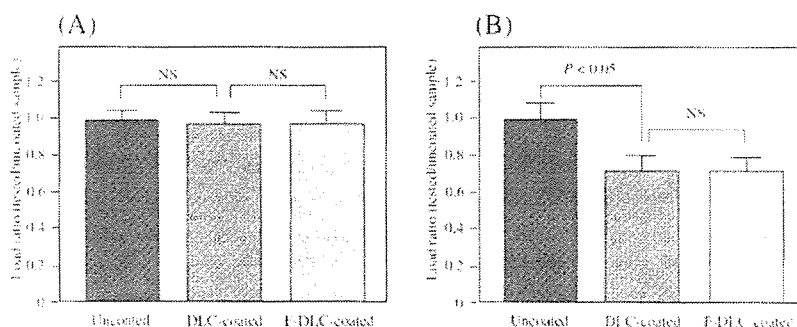


Fig. 4. Lubrication performance data for SUS316L, DLC-coated and F-DLC coated guidewires in under type-A (A) or type-B (B) vascular conditions (see Fig. 2). Maximum load ratio (DLC or F-DLC-coated wires/uncoated guidewires) was calculated ($n = 30$ times each group). Values are expressed as mean \pm standard deviation (SD) and were compared statistically by paired *t*-test, with $P < 0.05$ being considered statistically significant.

We recently reported the results of a quantitative and morphological study on platelet adhesion to DLC films, F-DLC-coated silicon (Si) and bare Si substrates incubated in platelet-rich plasma [20]. In that study, it was found that F-DLC possessed significantly better antithrombogenicity when compared with the other tested samples. In addition, F-DLC coating not only reduced the number of adherent platelets, but also inhibited platelet activation on the film. Another study reported that surface fluorination can be used to create surfaces with improved blood compatibility, hydrophobicity and chemical stability [23]. Incorporation of fluorine into DLC films is reported to greatly reduce film hardness while largely preserving other beneficial properties [24]. Therefore, the antithrombogenic and elastic features of F-DLC would be advantageous for coating three-dimensional medical devices when compared with conventional DLC coatings. Magurie et al. [21] recently reported that doping with silicon and the use of an a-Si:H interlayer in guidewire coating help minimize the risks of adhesion failure and film cracking. In the present study, we demonstrated the superior lubricity of DLC and F-DLC coatings when compared with uncoated stainless steel; however, further study is needed in order to investigate the durability and adhesion strength of DLC- or F-DLC-coated guidewires using an a-Si:H/a-Si:C:H interlayer.

Other groups are working on a variety of blood-compatible coatings, including a photoheparin formulation. Heparin coating has also showed a reduction in platelet attachment; however, it is unstable in the body and is derived from animal cells. Regulators in Europe, United States and Japan are concerned about the possible side effects of heparin, which could make it difficult to bring heparin-coated products to market. DLC and F-DLC coatings would thus be possible nonbiologic alternatives to heparin.

4. Conclusions

DLC or F-DLC films were deposited on SUS316L guidewires using the RF-CVD method and the lubrication performance was evaluated and compared with uncoated guidewires under in vitro conditions. The results obtained were as follows:

- (1) DLC- or F-DLC-coated SUS316L guidewires were observed by SEM, showing that DLC and F-DLC films were deposited evenly over the entire specimen, reducing the appearance of polishing scars.
- (2) DLC and F-DLC coatings improved lubricity of coated guidewires by approximately 30% when compared with uncoated guidewires (SUS316L) under in vitro conditions with strong friction drag.
- (3) Further study is needed to investigate coating strength and durability for clinical use.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the Keio University Special Grant-in-Aid for Innovative Collaborative Research Projects. We are also grateful for the advice and expertise of Dr. Yasuo Nakajima, Professor and Chairman of the Department of Radiology, St. Marianna University School of Medicine (Japan) and Dr. Atsushi Shimada of the Department of Thoracic-Cardiovascular Surgery, Kitasato University School of Medicine (Japan).

References

- [1] D.F. Kallmes, J.K. McGraw, A.J. Evans, J.M. Mathis, R.W. Hergenrother, M.E. Jensen, H.J. Cloft, M. Lopes, J.E. Dion, *Am. J. Neuroradiol.* 18 (1997) 1243.
- [2] K.R. Leach, Y. Kurisu, J.E. Carlson, I. Repa, D.H. Epstein, M. Umess, R. Sahatjian, D.W. Hunter, W.R. Casteneda-Zuniga, K. Amplatz, *Radiology* 175 (1990) 675.
- [3] C. Angus, P. Koidl, S. Domitz, in: J. Mort, F. Jansen (Eds.), *Plasma Deposited Thin Films*, CRC Press, Inc., Boca Raton, 1986, p. 89.
- [4] A. Grill, *Diamond Relat. Mater.* 8 (1999) 428.
- [5] L.A. Thomson, F.C. Law, N. Rushton, J. Franks, *Biomaterials* 12 (1991) 37.
- [6] G. Deamaley, *Clin. Mater.* 12 (1993) 237.
- [7] L. Lu, M.W. Jones, R.L. Wu, *Biomed. Mater. Eng.* 3 (1993) 223.
- [8] R. Lappalainen, H. Heinonen, A. Anttila, S. Santavirta, *Diamond Relat. Mater.* 7 (1998) 482.
- [9] A. Schroeder, G. Francz, A. Bruinink, R. Hauert, J. Mayer, E. Wintemantel, *Biomaterials* 21 (2000) 449.
- [10] C. Du, X.W. Su, F.Z. Cui, X.D. Zhu, *Biomaterials* 19 (1998) 651.
- [11] M. Allen, B. Myer, N. Rushton, *J. Biomed. Mater. Res.* 58 (2001) 319.
- [12] S. Affatato, M. Frigo, A. Toni, *J. Biomed. Mater. Res.* 53 (2000) 221.
- [13] M. Allen, F. Law, N. Rushton, *Clin. Mater.* 17 (1994) 1.
- [14] S. Linder, W. Pinkowski, M. Aepfelbacher, *Biomaterials* 23 (2002) 767.
- [15] M. Mohanty, T.V. Anilkumar, P.V. Mohanan, C.V. Muraleedharan, G.S. Bhuvaneshwar, F. Derangere, Y. Sampeur, R. Suryanarayanan, *Biomol. Eng.* 19 (2002) 125.
- [16] I. De Schroeder, M. Szilard, H. Yanming, X.B. Ping, E. Verbeken, D. Neerincx, E. Demeyere, W. Coppens, F. Van de Werf, *J. Invasive. Cardiol.* 12 (2000) 389.
- [17] K. Gutensohn, C. Beythien, J. Bau, T. Fenner, P. Grewe, R. Koester, K. Padmanaban, P. Kuehn, *Thromb. Res.* 99 (2000) 577.
- [18] F. Airolidi, A. Colombo, D. Tavano, G. Stankovic, S. Klugmann, V. Paolillo, E. Bonizzoni, C. Briguori, M. Carlino, M. Montorfano, F. Liistro, A. Castelli, A. Ferrari, F. Sgura, C. Di Mario, *Am. J. Cardiol.* 93 (2004) 474.
- [19] H.S. Tran, M.M. Puc, C.W. Hewitt, D.B. Soll, S.W. Marra, V.A. Simonetti, J.H. Cilley, A.J. DelRossi, *J. Invest. Surg.* 12 (1999) 133.
- [20] T. Saito, T. Hasebe, S. Yohena, Y. Matsuoka, A. Kamijo, K. Takahashi, T. Suzuki, *Diamond Relat. Mater.* 14 (2005) 1116.
- [21] P.D. Maguire, J.A. McLaughlin, T.I.T. Okpalugo, P. Lemoine, P. Papakonstantinou, E.T. McAdams, M. Needham, A.A. Ogwu, M. Ball, G.A. Abbas, *Diamond Relat. Mater.* In Press, Corrected Proof, Available online 25 February 2005.
- [22] J.A. McLaughlin, B. Meenan, P. Maguire, N. Jamieson, *Diamond Relat. Mater.* 5 (1996) 486.
- [23] J.Y. Ho, T. Matsuura, J.P. Santerre, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 11 (2000) 1085.
- [24] R. Memming, *Thin Solid Films* 143 (1986) 279.



Antithrombogenicity of fluorinated diamond-like carbon films

T. Saito^{a,1}, T. Hasebe^{a,b,*,1}, S. Yohena^a, Y. Matsuoka^a, A. Kamijo^c, K. Takahashi^c, T. Suzuki^a

^aCenter for Materials Science, Department of Mechanical Engineering, Keio University School of Science and Technology, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522, Japan

^bDepartment of Radiology, Tachikawa Hospital, 4-2-22 Nishiki-cho, Tachikawa, Tokyo 190-8531, Japan

^cDepartment of Transfusion Medicine, the University of Tokyo Hospital, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan

Available online 6 November 2004

Abstract

Effects of doping with fluorine to diamond-like carbon (DLC) films on the antithrombogenicity were investigated by changing its content. Fluorinated DLC (F-DLC) films were prepared on silicon (Si) substrates using radio frequency (RF) plasma enhanced chemical vapour deposition (CVD) by changing the ratio of hexafluoroethane (C_2F_6) and acetylene (C_2H_2). The contact angle measurements of human whole blood droplet on Si, DLC and F-DLC were 24.2° , 60.8° and 95.3° , respectively. Furthermore, the static evaluation of F-DLC films incubated with platelet-rich plasma (PRP) showed dramatic reduction of platelet adhesion and activation on the surface. It was found that the addition of fluorine into DLC films much improved antithrombogenicity, which was clearly shown by scanning electron microscopy (SEM) with statistical analysis. F-DLC coating can be a great candidate for developing antithrombogenic surfaces in blood contacting materials.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Fluorinated diamond-like carbon; Hydrophobicity; Platelet adhesion; Antithrombogenicity

1. Introduction

Biomaterial implants such as vascular grafts, artificial heart valves or interventional devices (stents, guidewires and catheters) have been gaining widespread use with development of medical engineering. Thrombogenic complication remains as one of the main problems for blood contacting implants, which triggers the life-threatening device failure. For example, it has been reported that the restenosis after coronary stenting statistically occurs 20% to 40% [1–4]. Recent study has shown that the thrombus formation after intraarterial stent implantation provides a stimulus for neointimal hyperplasia and, if excessive, can result in stent thrombosis at sites of coronary stenting in humans [4]. Surface modification techniques are indispensable for

improving both the mechanical and physical properties of these implants in direct contact with the blood and tissue.

Recently, diamond-like carbon (DLC) films have received much attention because of their antithrombogenicity, which inhibits platelet adhesion and activation [5–7]. However, the blood coagulation mechanism on DLC films in biological environment has not been well understood so far. There have been several reports that cell adhesion on DLC films is related to surface energy and wettability [8–12]. They suggested that hydrophobic surface tends to inhibit blood cell adsorption. As for hydrophobic property, it is well known that fluorocarbon polymers present great water-shedding characteristics. Thus, we consider that the addition of fluorinate has potential to develop haemocompatibility of materials.

2. Experimental

2.1. Film preparations and characterization

Conventional DLC and fluorinated DLC (F-DLC) films were prepared on Silicon (Si) substrates using radio

* Corresponding author. Center for Materials Science (Suzuki lab.), Department of Mechanical Engineering, Keio University School of Science and Technology, 3-14-1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama, Kanagawa 223-8522, Japan. Tel.: +81 45 563 1141; fax: +81 45 566 1495.

E-mail address: teru_hasebe@hotmail.com (T. Hasebe).

frequency (RF) plasma enhanced chemical vapour deposition (CVD) method by changing the ratio of hexafluoroethane (C_2F_6) and acetylene (C_2H_2). The RF (13.56 MHz) power and total pressure were fixed at 200 W and 13.3 Pa, respectively. DLC films were deposited from C_2H_2 and F-DLC films from a mixture of C_2H_2 and C_2F_6 , and the thickness of DLC and F-DLC films was 40 to 50 nm, respectively. According to partial pressure of C_2F_6 , each F-DLC film was denoted as follows: for example, F-DLC20 indicates that F-DLC films were deposited under partial pressure of C_2F_6 at 20% of the total pressure.

Surface chemical compositions and bonding states of DLC and F-DLC films were measured by the X-ray photoelectron spectroscopy (XPS; JPS-9000MX, JEOL). The wettability of Si, DLC and F-DLC80 were evaluated by measuring the static contact angles between a droplet of human whole blood (10 μ l) and the samples surfaces.

2.2. Platelet adhesion and activation

Human whole blood (45 ml) from a healthy volunteer without any medication for at least 10 days was collected and mixed with 5 ml of acid-citrate-dextrose (ACD), and then the blood was centrifuged at 180 $\times g$ for 10 min to separate the blood corpuscles, and the resulting platelet-rich plasma (PRP) was prepared. Subsequently, the rest of whole blood was centrifuged at 2000 $\times g$ for 20 min to obtain the platelet-poor plasma (PPP). The density of platelets in PRP was adjusted to a concentration of 2×10^5 cells/ μ l by diluting with PPP. After rinsing samples with phosphate-buffered saline (PBS), the samples disks with a surface area of 100 mm² were incubated in a 24-wells plate with 2 ml of adjusted PRP for 60 min with 5% of CO₂ gas at 37 °C ($n=5$ disks for each sample). Thereafter, the supernatant was discarded, and the samples were washed with PBS. The adherent platelets were then fixed with 1 ml of freshly prepared 1.0% of glutaraldehyde for 60 min at room temperature. After fixation, the

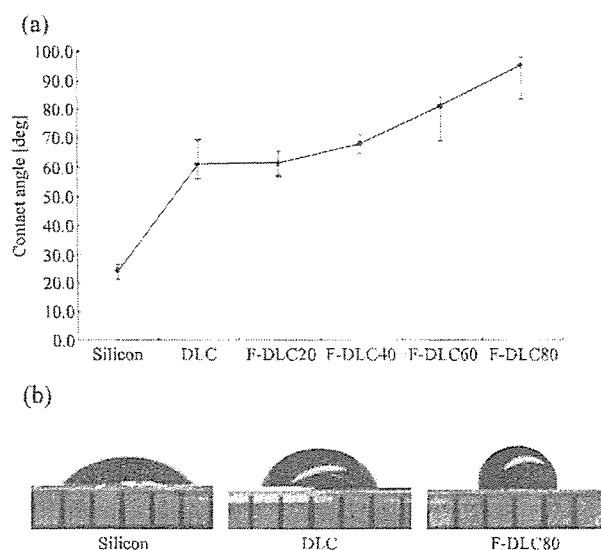


Fig. 2. Contact angle measurements of 10- μ l whole human blood droplet on the sample surface (wettability). The values of contact angle dramatically increased with increasing the ratio of doped fluorine (a). F-DLC80 showed the most hydrophobic property (b).

samples were washed and dehydrated in a graded ethanol series (20%, 40%, 60%, 80%, 100% and 100% for 15 min each), as described previously [13]. Dehydrated materials were put in a vacuum chamber and dried overnight. The entirely dried materials were coated with gold and investigated by a scanning electron microscopy (SEM; S-3100H, HITACHI).

Adhering platelets were manually counted on photographs per unit area (6000 μ m²). Results of the experiments are expressed as means of counts/unit area and standard error (SE). Values were compared statistically by unpaired *t* test. Results with $P < 0.05$ were considered to be statistically significant. Additionally, the morphological shape changes were categorized to Goodman et al. and

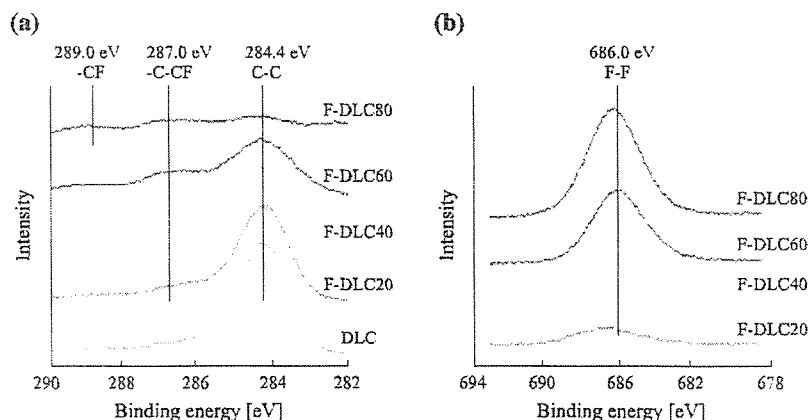


Fig. 1. XPS spectra of DLC, F-DLC20, F-DLC40, F-DLC60 and F-DLC80. (a) C1s XPS, (b) F1s XPS.

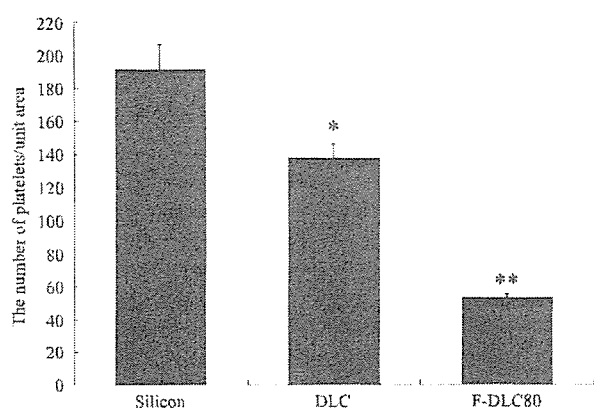


Fig. 3. The number of adhering platelets counted on Si substrate, DLC and F-DLC80. The number of platelets per unit area ($6000 \mu\text{m}^2$) was counted. The values are the mean of five areas of each sample, while the error bars denote the standard deviation. * denotes significant difference from control Si substrate (* $P < 0.05$), ** denotes significant difference from Si or DLC (** $P < 0.001$).

Allen et al. [14,15] as (I) round or discoid, (II) dendritic or early pseudopodial, (III) spread-dendritic or intermediate pseudopodial, (IV) spreading or late pseudopodial and (V) fully spread.

3. Results and discussion

3.1. Chemical compositions and bonding

Fig. 1(a) and (b) shows the local spectra of C1s and F1s for DLC, F-DLC20, F-DLC40, F-DLC60 and F-DLC80 by XPS. The horizontal axis corresponds to binding energy [eV] and the vertical axis to intensity. By taking curve fitting to each spectrum, they were well decomposed into main three peaks, which centered at ~ 284.4 , ~ 287.0 and ~ 289.0 eV, respectively. Due to the surface contamination and charging effect during XPS analysis, it is very complex and also still controversial to identify these peaks.

As shown in Fig. 1, the peak intensity for C–C bond (284.4 eV) gradually decreased (Fig. 1(a)) and the peak intensity for F–F bond (686.0 eV) gradually increased (Fig. 1(b)) with increasing pressure of C_2F_6 gas during deposi-

tion. This indicates that the pressure of C_2F_6 influences the ratio of fluorine on the topmost surface of films. Furthermore, in the spectra of F-DLC films, there were some peaks indicating bonds of carbon and fluorine. The spectra of F-DLC20, F-DLC40 and F-DLC60 showed the existence of C–CF bond (287.0 eV) as well as C–C bond. The spectrum of F-DLC80 showed the existence of C–F bond (289.0 eV) in addition to C–CF and C–C bonds. Bonding structures of carbon and fluorine show low polarizability, which leads to low surface energy with increasing the hydrophobicity of F-DLC films.

3.2. Contact angle measurements

Fig. 2 shows the results of contact angle measurements for three different samples. These results indicated the dramatic improvement of wettability for DLC and F-DLC films. The contact angles of human blood on Si, DLC and F-DLC80 were 24.2° , 60.8° and 95.3° , respectively. For the DLC films, the contact angle increased by 2.51 times compared to that of Si substrate. In particular, F-DLC80 is the most hydrophobic, and the contact angle for F-DLC80 increased by 3.94 times compared to that of Si.

The more hydrophobic a surface is, the higher the interfacial free energy between the solid and liquid phases. The interfacial free energy determines the wetting characteristics and hence the wall shear stress generated when the liquid comes into contact with the surface. It is considered that the polarization of C–F and C–CF bonds on the topmost surface of F-DLC80, proven by the XPS analysis, can lower the surface energy and the results in the increase in contact angles.

3.3. Platelet adhesion and activation

Platelets play a pivotal role in thrombogenicity of biomaterials in blood contacting applications, and the reduction of platelet adhesion and activation is determinant for the eventual success of any application. The initial local response to foreign surface in the body is mainly catalyzed by surface-absorbed proteins, which trigger numerous processes such as cellular activation, inflammatory and complement activation and attraction of circulating platelets.

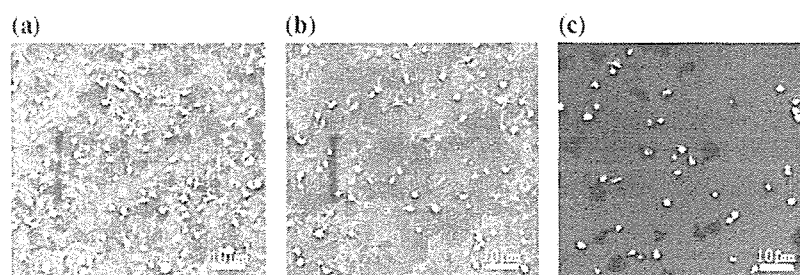


Fig. 4. Morphology of adherent platelets on (a) Si, (b) DLC and (c) F-DLC surfaces (60 min incubation in PRP) observed using SEM. Si substrate: dense platelet layers (categories IV and V). DLC: lower density of platelets compared to Si (categories III to V). F-DLC80: a few platelets (categories uniformly I to V).

During activation, the platelets attach to the sample surface, and they change in shape in developing pseudopodia versus their activation level [12]. Thus, the investigation of platelet adhesion must support the thrombogenicity evaluation of biomaterials.

Fig. 3 shows the adherent platelets counts on the three different samples by SEM. This result clearly demonstrated that the number of platelets per unit area for DLC or F-DLC80 was significantly smaller compared to that of Si substrate ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively). In addition, the number of platelets on F-DLC80 was significantly smaller than that of DLC ($P < 0.001$). The morphology of the attached platelets after 60 min of incubation is displayed as shown in Fig. 4. Si substrate showed a dense platelet layer with predominantly spread platelets (categories IV and V) (Fig. 4(a)), whereas, on F-DLC80, a few platelets adhered, and the categories of platelets uniformly varied between I to V (Fig. 4(c)). DLC films showed that almost all the platelets were categorized into III to V (Fig. 4(b)).

In this present study, DLC and F-DLC coatings could suppress the adhesion and activation of platelets compared to Si substrate. The surface that promoted the greatest spreading of platelets, i.e., the Si substrate, is the most hydrophilic in the tested samples. In contrast, F-DLC coating, which caused less activation, was most hydrophobic in the tested samples. This suggests that the wettability of a biomaterial surface determines in part its blood compatibility. However, it has been described to be influential that blood compatibility is not solely determined by wettability and also the specific chemical composition, interfacial free energy and a higher ratio of albumin/fibrinogen adsorption of biomaterial surfaces [16,17]. The mechanism of biomaterial-associated thrombosis is not fully clear. It is very complicated to determine all factors that contributed to novel antithrombogenic properties of F-DLC films in this study. Further in vitro and in vivo studies are needed to investigate all of the factors related with biomaterial-associated thrombosis.

4. Conclusion

We have presented an engineering analysis of fluorine-doped DLC films and quantitative and morphological studies on platelet adhesion to DLC films or F-DLC coated Si and bare Si substrate incubated in PRP. In this study, we described a novel antithrombogenic effect by doping with fluorine into DLC films compared to Si substrate and conventional DLC. Our experiments showed that an addition of fluorine into DLC films enhanced the water-

shedding properties. The number of platelets per unit area decreased in order of Si, DLC and F-DLC80. It was found that F-DLC showed the best antithrombogenicity among the tested samples. In addition, DLC and F-DLC coating inhibited the platelets activation, as well as the number of platelets on the film surface.

The presented F-DLC appears to be a promising candidate coating material for blood contacting devices, such as interventional devices, artificial organs and pace-makers. However, more basic study and long-term implantation are needed.

References

- [1] D.L. Fischman, M.B. Leon, D.S. Baim, R.A. Schatz, M.P. Savage, I. Penn, K. Detre, L. Veltri, D. Ricci, M. Nobuyoshi, M. Cleman, R. Heuser, D. Almond, P.S. Teirstein, R.D. Fish, A. Colombo, J. Brinker, J. Moses, A. Shaknovich, J. Hirshfeld, S. Bailey, S. Ellis, R. Rake, S. Goldberg, *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 496.
- [2] P.W. Serruys, P. de Jaegere, F. Kiemeneij, C. Macaya, W. Rutsch, G. Heyndrickx, H. Emanuelsson, J. Marco, V. Legrand, P. Materne, J. Belardi, U. Sigwart, A. Colombo, J.J. Goy, P. van den Heuvel, J. Delcan, M. Morel, *N. Engl. J. Med.* 331 (1994) 489.
- [3] P. Rubartelli, L. Niccoli, E. Verna, C. Giachero, M. Zimarino, A. Fontanelli, C. Vassanelli, L. Campolo, E. Martuscelli, G. Tommasini, *J. Am. Coll. Cardiol.* 32 (1998) 90.
- [4] R. Komatsu, M. Ueda, T. Naruko, A. Kojima, A.E. Becker, *Circulation* 98 (1998) 224.
- [5] L.A. Thomson, F.C. Law, N. Rushton, J. Franks, *Biomaterials* 12 (1991) 37.
- [6] I. Dion, X. Roques, C. Baquay, E. Baudet, B. Basse Cathalinat, N. More, *Bio-Med. Mater. Eng.* 3 (1993) 51.
- [7] H.S. Tran, M.M. Puc, C.W. Hewitt, D.B. Soll, S.W. Marra, V.A. Simonetti, J.H. Cilley, A.J. DelRossi, *J. Invest. Surg.* 12 (1999) 133.
- [8] M.I. Jones, I.R. McColl, D.M. Grant, K.G. Parker, T.L. Parker, *Diamond Relat. Mater.* 8 (1999) 457.
- [9] M.I. Jones, I.R. McColl, D.M. Grant, K.G. Parker, T.L. Parker, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 413.
- [10] T.I. Okpalugo, A.A. Ogwu, P.D. Maguire, J.A. McLaughlin, *Biomaterials* 25 (2004) 239.
- [11] P. Yang, N. Huang, Y.X. Leng, J.Y. Chen, R.K. Fu, S.C. Kwok, Y. Leng, P.K. Chu, *Biomaterials* 24 (2003) 2821.
- [12] N. Nurdin, P. Francois, Y. Mugnier, J. Krumeich, M. Moret, B.O. Aronsson, P. Descouts, *Eur. Cell. Mater.* 5 (2003) 17.
- [13] R.D. Frank, H. Dresbach, H. Thelen, H.G. Sieberth, J. Biomed. Mater. Res. 52 (2000) 374.
- [14] S.L. Goodman, T.G. Grasel, S.L. Cooper, R.M. Albrecht, J. Biomed. Mater. Res. 23 (1989) 105.
- [15] R.D. Allen, L.R. Zacharski, S.T. Widirstky, R. Rosenstein, L.M. Zaitlin, D.R. Burgess, *J. Cell Biol.* 83 (1979) 126.
- [16] B.J. Hunt, R. Parratt, M. Cable, D. Finch, M. Yacoub, *Blood Coagul. Fibrinolysis* 8 (1997) 223.
- [17] H.T. Spijker, R. Bos, H.J. Busscher, T.G. von Kooten, W. von Oeveren, *Biomaterials* 23 (2002) 757.

ORIGINAL ARTICLE

Preservation of ovarian function by ovarian shielding when undergoing total body irradiation for hematopoietic stem cell transplantation: a report of two successful cases

K Nakagawa¹, Y Kanda², H Yamashita¹, Y Hosoi¹, K Oshima², K Ohtomo¹, N Ban³, S Yamakawa¹, S Nakagawa⁴ and S Chiba²

¹Department of Radiology, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan; ²Department of Cell Therapy & Transplantation Medicine, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan; ³Department of Health Sciences, Oita University of Nursing and Health Sciences, Oita, Japan and ⁴Department of Gynecology, University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

The purpose of this study was to evaluate the possibility of preserving ovarian function by ovarian shielding to reduce the irradiation dose in total body irradiation (TBI). The subjects in the study were females aged less than 40 years, who were undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a TBI-based regimen and who desired to have children after transplantation. For ovarian shielding, abdominal computed tomography (CT) and skin marking were performed in both the supine and prone positions, prior to the TBI. A pair of columnar blocks was placed just above the patient's body. Thus far three patients have been treated. The serum estradiol level decreased to an undetectable level (<8.5 pg/ml) after transplantation and the follicle-stimulating hormone (FSH) level increased above 90 mIU/ml in all patients and they became amenorrheic. However, regular menstruation recovered in patients no. 1 and 2 about 800 and 370 days after transplantation, respectively, with a decrease in the serum FSH level. Menstruation did not recover in patient no. 3, and serum estradiol was transiently detected above 20 pg/ml. The preservation of ovarian function was made possible by ovarian shielding. However, a longer follow-up is needed to know if normal pregnancy and delivery can occur.

Bone Marrow Transplantation (2006) 37, 583–587. doi:10.1038/sj.bmt.1705279; published online 30 January 2006

Keywords: ovarian function; total body irradiation; ovarian shielding; stem cell transplantation

Introduction

The conditioning regimen before allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is intended to eradicate tumor cells and to promote immunosuppression to prevent graft rejection. A combination of cyclophosphamide and total body irradiation (TBI) is the most widely used regimen in transplantation for leukemia. However, this regimen causes severe germ cell injury and infertility.^{1–12} On the other hand, patients who have received cyclophosphamide alone for aplastic anemia frequently recover ovarian function after transplantation. Considering that the dose of cyclophosphamide in transplantation for aplastic anemia is usually higher than that in transplantation for leukemia (200 vs 120 mg/kg), we explored the possibility of preserving ovarian function by reducing the irradiation dose by ovarian shielding.

Patients and methods

Patients

Three female patients aged less than 40 years, who were undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation using a TBI-based regimen and who desired to have children after transplantation, were the subjects of this study. The study was approved by the Ethics committee of the University of Tokyo Hospital and all patients gave informed consent to participate in this study.

Transplantation procedure

The preparative regimen was a combination of cyclophosphamide at 60 mg/kg/day for 2 days and TBI at 2 Gy twice daily for 3 days. In patient no. 3, the dose of cyclophosphamide was reduced to 40 mg/kg/day for 1 day and etoposide at 20 mg/kg/day for 2 days was added instead, because of impaired cardiac function before transplantation. Cyclosporin A was administered as a continuous infusion at a dose of 3 mg/kg/day combined with short-term methotrexate (10–15 mg/m² on day 1 and 7–10 mg/m² on days 3 and 6, and optionally on day 11) to prevent GVHD. Patient no. 3, who underwent transplantation from a

Correspondence: Dr K Nakagawa, Department of Radiology, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113, Japan.
E-mail: nakagawa-rad@umin.ac.jp

Received 16 June 2005; revised 21 November 2005; accepted 25 November 2005; published online 30 January 2006

two-locus-mismatched sibling donor, received alemtuzumab at 0.2mg/kg/day from day -8 to day -3.¹³ Methyl-prednisolone at 1-2 mg/kg/day was added for patients who developed grade II-IV GVHD. Prophylaxis against bacterial, fungal and *Pneumocystis carinii* infection consisted of fluconazole, ciprofloxacin, and sulfamethoxazole/trimethoprim. For prophylaxis against herpes simplex virus infection, acyclovir was given 750 mg/day intravenously or 1000 mg/day orally from days -7 to 35, followed by long-term low-dose (400mg/day) oral administration until the end of immunosuppressive therapy. A cytomegalovirus antigenemia assay using C10/C11 antibody was performed at least once a week after engraftment. Ganciclovir was started when more than two positive cells were detected on two slides.

TBI and ovarian shielding

Patients were treated in a mobile box made of 10 mm thick polymethyl methacrylate 600 mm wide by 2000 mm long by 400 mm high. The box is capable of moving up to 250 cm forward and backward on the rails with a constant speed. Beam intensity and moving velocity defined dose rate in TBI.¹⁴ Normally, beam opening of the linac is $400 \times 10 \text{ cm}^2$. Leukemia patients were usually treated in the supine position for three fractions in the morning and in the prone position for three fractions in the evening.

The center of the mobile box was selected to be a reference point to attain the prescribed dose. Beam intensity and moving velocity were determined based on the measurement of the doses in Mix-DP slab phantoms with an ionization chamber, but no corrections for patient body size were required due to the use of the mobile box.

In TBI for the leukemia patients, most commonly, a pair of customized metal blocks was placed on the mobile box for lung shielding. The blocks were fabricated according to the lung shape, which was obtained by use of the X-ray film taken in the box. Lung shielding was performed in a fraction of TBI out of six fractions for three consecutive days in most cases.

For ovarian shielding, abdominal magnetic resonance imaging (MRI) and computed tomography (CT) were performed prior to the TBI. Position of the ovaries was checked with T2-weighted image of MRI and was projected and marked onto the patient's skin. Trans-abdominal ultrasound on the day of treatment was performed for the accurate positioning of the shields. As the ovarian shielding was performed in all six fractions, CT scan and skin marking were performed both in supine and prone positions. A pair of columnar blocks (8 cm in height and 5 cm in diameter) was placed just above the patient's body, as demonstrated in Figures 1 and 2. For ovarian shielding, beam opening was $40 \times 2 \text{ cm}^2$ to decrease penumbra. Figure 3 shows a portal image taken during an actual TBI with ovarian shielding.

Actual measurement for humanoid phantom

Actual doses to the ovary were measured with glass dosimeters within a humanoid phantom. Doses of 2 Gy in the supine position and 2 Gy in the prone position were given for total body with the tracking technique. Twelve glass dosimeters were placed at the ovarian position of the humanoid phantom under shielding (Figure 4).

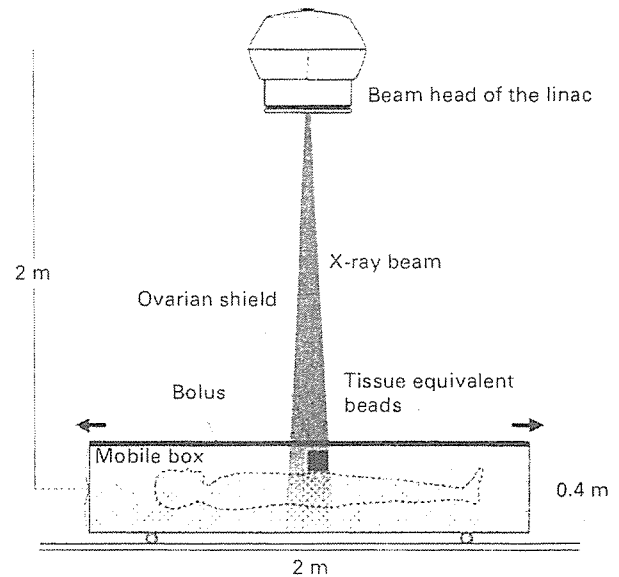


Figure 1 A schematic illustration of ovarian shielding in TBI.

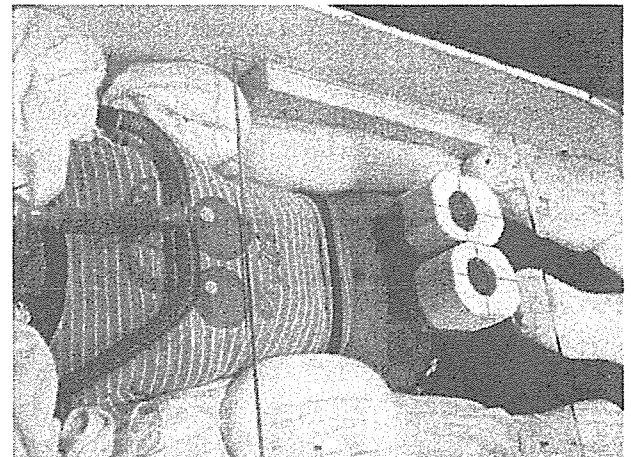


Figure 2 A pair of columnar blocks with dimensions of 8 cm in height and 5 cm in diameter. It was placed just above the patient's body.

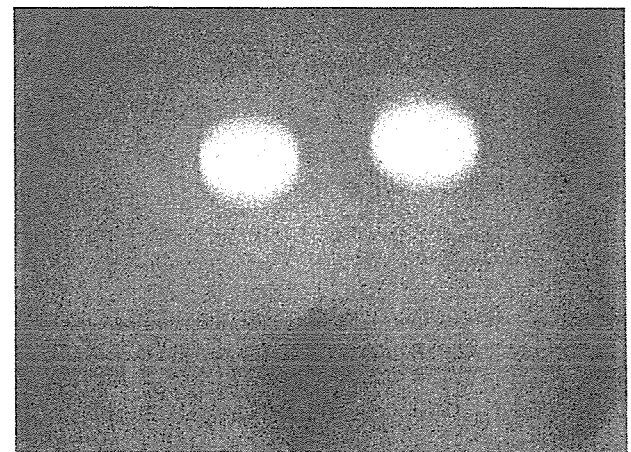


Figure 3 A portal image taken during an actual TBI with ovarian shielding.

Results

Patients

Thus far, three patients have been treated (Table 1). Two had chronic myelogenous leukemia in first chronic phase and had not received intravenous of antineoplastic agents before transplantation. The other patient had acute lymphoblastic leukemia in second remission and had received multiple courses of intensive chemotherapy. The donors were a matched unrelated donor, an HLA-identical sibling donor, and a two-locus-mismatched sibling donor in patients no. 1, 2, and 3, respectively. Patients no. 1 and 2 had regular menstruation before transplantation, but patient no. 3 already had chemotherapy-induced amenorrhea.

Transplantation outcome

All three patients had donor cell engraftment between days 15 and day 31 after transplantation. Acute GVHD was observed in only patient no. 1. She developed grade II acute GVHD limited to the skin, which was followed by extensive chronic GVHD. Patients no. 1 and 2 are alive without leukemia on days 1163 and 1055 after transplantation, respectively. However, patient no. 3 had a relapse of leukemia on day 223 and died on day 522.

Ovarian function after transplantation

The serum estradiol level decreased to an undetectable level (<8.5 pg/ml) after transplantation and the follicle-stimu-

lating hormone (FSH) level increased above 90 mIU/ml in all patients and they became amenorrheic (Figure 5). However, patients no. 1 and 2 recovered regular menstruation about 800 and 370 days after transplantation, respectively, with a decrease in serum FSH level. In patient

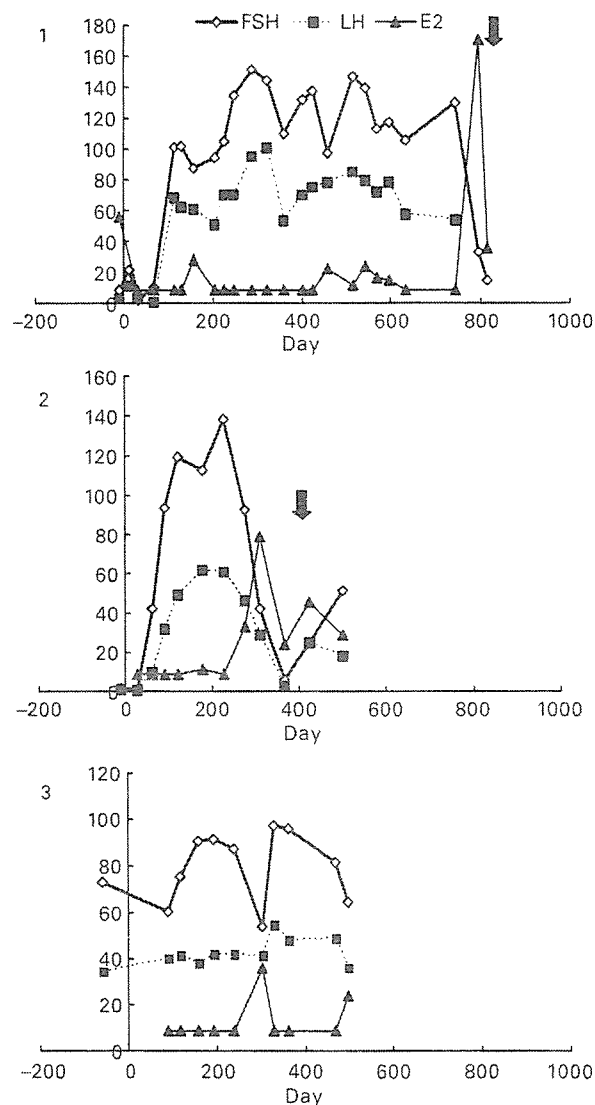


Figure 5 Ovarian function after transplantation. Arrows indicate the day of menstruation recovery.

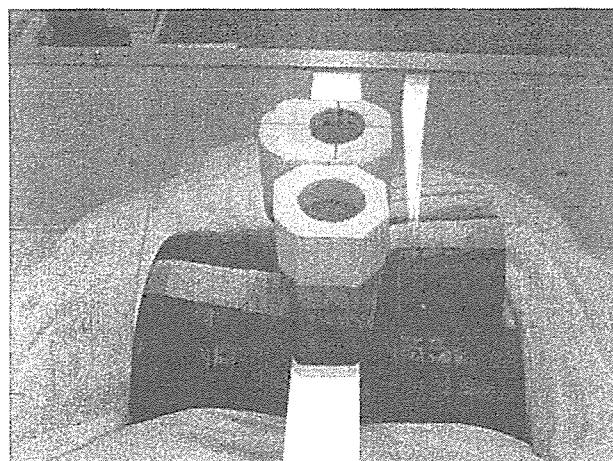


Figure 4 Humanoid phantom experiment.

Table 1 Patient characteristics

	Age ^a	Diagnosis	Duration ^b	Prior Tx	Regimen	TBI dose (Gy)	Donor
1	20	CML	7 years	HU, IFN	Cy/TBI	12	MUD
2	25	CML	6 months	HU	Cy/TBI	12	ISD
3	27	ALL	6 years	CCT	ETP/Cy/TBI	12	PMRD

^aAge at transplantation.

^bDuration from diagnosis to transplantation.

CML = chronic myelogenous leukemia; ALL = acute lymphoblastic leukemia; HU = hydroxyurea; IFN = interferon alpha; CCT = multiple courses of combined chemotherapy; Cy = cyclophosphamide; TBI = total body irradiation; ETP = etoposide; MUD = matched unrelated donor; MSD = HLA-identical sibling donor; PMRD = partially mismatched related donor.