

酸素プラズマ処理を施した DLC の細胞増殖性の検討

Effect of oxygen plasma treatment on the cell growth of DLC films

○ 日比野麻衣(電機大) 木村洋裕(電機大) 大越康晴(電機大)

アズランアズヒム(UTM) 増子貞光(株式会社三共製作所)

平塚傑工(ナノテック株式会社) 尾関和秀(茨城大) 中森秀樹(ナノテック株式会社)

斎藤秀俊(長岡技科大) 平栗健二(電機大) 福井康裕(電機大)

Mai HIBINO, Tokyo Denki University; Yousuke KIMURA, Tokyo Denki University;
 Yasuharu OHGOE, Tokyo Denki University; Azran AZHIM, Universiti Teknologi Malaysia;
 Sadamitsu MASUKO, Sankyo Seisakusho Co.; Masanori HIRATSUKA, Nanotec Corp.;
 Kazuhide OZEKI, Ibaraki University; Hideki NAKAMORI, Nanotec Corp.;
 Hidetoshi SAITOH, Nagaoka University of Technology; Kenji HIRAKURI, Tokyo Denki University;
 Yasuhiro FUKUI, Tokyo Denki University

Abstract: Nine kinds of diamond-like carbon (DLC) samples which had been deposited on each polystyrene (PS) dish ($\phi 35\text{mm}$) by various chemical vapor deposition (CVD) and physical vapor deposition (PVD) technique were treated by oxygen plasma across the board. In the cell culture, mouse fibroblasts (NIH-3T3) were used to estimate the cellular responses on the plasma treated DLC samples. In case of the DLC samples which were low cell adhesion type, the cell growth rose even to the same level as a PS dish by the plasma treatment. On the other hand, in case of the good cell adhesion type of DLC samples, cell growth of the DLC decreased even to the level of PS dish. The PS dish has good cell growth as a control. Regardless of the type of DLC samples, it is expected that the oxygen plasma treatment can perform surface modification for cell growth equal to PS dish level.

Key Words: DLC, Oxygen plasma treatment, Cell growth

1. 背景

近年では、医学、薬学、工学の複合した境界領域分野の技術が、人工心臓、人工歯根、人工関節などの高度医療を切り開いている。特に、新材料の創成による生体材料への応用が医療技術の進歩を飛躍的に向上させている⁽¹⁾。その中の一つである炭素系材料の DLC(diamond-like carbon)膜は、高硬度、耐腐食性、耐摩耗性、摺動性に優れた特性を有する。また、各種成膜手法の開発により抗血栓性、細胞親和性、抗菌性など様々な DLC が提案され医療材料として注目を集めている⁽²⁾。

この DLC 膜は、ダイヤモンドの sp^3 結合とグラファイトの sp^2 結合が混在するアモルファス構造を有する。この二つの結合比率および膜中の水素含有量と膜密度は、DLC の物性値を決定する重要な要素である。また、CVD(Chemical Vapor Deposition)法や PVD(Physical Vapor Deposition)法などに大別される成膜手法は数多く、DLC の物性値は、成膜手法を含め各種成膜条件に大きく依存する⁽³⁾。そのため、学術的な定義が存在しない DLC は、名前は DLC と同じでも、成膜条件によってその物性は大きく異なる。それゆえ、専門知識を有しない DLC 一般ユーザの立場では、目的の DLC について、適切な成膜方法に関する情報が得られず、十分に活用できない点が問題となっている⁽⁴⁾。特に医療分野では、抗血栓性、細胞親和性、抗菌性を有する DLC が注目される他にも、歯科材料、手術器具表面の保護膜としての応用など、一言で DLC と表現するにはあまりにも幅広く、前述の通り、特性が全く異なる DLC が、同一の DLC として誤解されることが多々見受けられる。

これまで我々は、細胞増殖性という観点から、各種成膜手法や条件によって作製された“DLC”の生体適合性に

ついて検討してきた。その結果、各種 DLC の細胞増殖の程度を、物性的特性に応じて 4 つに分類し、細胞増殖を促進する DLC と抑制する DLC に整理した^(4,5)。

DLC の用途が広がる昨今、従来の DLC に表面処理を施し、使用用途に応じて特定の特性を付加することが行われている。過去の研究では、DLC 表面に対し、酸素プラズマ処理を施すことで、細胞増殖促進効果が得られる事がよく知られている⁽⁶⁾。そこで本研究では、細胞増殖促進や抑制効果を有する各種 DLC に対し、一律に酸素プラズマ処理を施し、細胞増殖に対する DLC の表面処理効果について検討した。

2. 実験方法

2-1 成膜方法

CVD 法及び PVD 法により、各種 DLC 膜をポリスチレン製 35 mm ディッシュ(BD 35×10 mm Easy Grip Dish)に膜厚 300 nm 一定にて成膜し、その後酸素プラズマ処理を施した。

2-2 細胞培養実験

ポリスチレン製ディッシュに成膜した各種 DLC について一律に酸素プラズマ処理を施し、Table 1 の条件で細胞培

Table 1 Cell culture conditions

Cell	Mouse fibroblast (NIH-3T3)
Seeding density	$0.4 \pm 0.1 \times 10^4$ [cell/cm ²]
Medium	D-MEM/F-12
CO ₂ concentration	5.0 [%]
Temperature	37.0 [°C]
Incubation time	72 [h]

養試験を行った。この時、比較として酸素プラズマ処理を施していない DLC についても、同様に細胞培養試験を行い、酸素プラズマ処理効果について比較検討した。

2-3 評価方法

①DLC 膜の表面特性評価

XPS(X-ray photoelectron spectroscopy)による表面の組成評価、AFM (Atomic Force Microscope)による表面粗さ評価を行った。

②細胞増殖評価

細胞培養試験終了後、各サンプルに CellTiter-Blue™を添加し、分光光度計を用いて、波長 570 nm で吸光度を測定し、細胞増殖を定量化した。

3. 結果

Fig.1 に、各種 DLC における細胞増殖試験の結果を示す。なお、“Control”は、比較のために、DLC 成膜および酸素プラズマ処理を施していないディッシュにて同条件にて細胞培養試験を行い、この時の細胞増殖を 1 としたものである。

Sample 1, 2, 5, 6, 7 のように、細胞増殖を抑制する種類の DLC では、酸素プラズマ処理により、Control と同等の増殖性を示した。これらの DLC の表面は、Table 2 に示すように、酸素プラズマ処理によって、Carbon 1s peak 中の C=O peak が $20 \pm 3\%$ まで増加した。一方、Sample 3, 8, 9 のように、細胞増殖を促進する DLC では、酸素プラズマ処理により、C=O peak は $20 \pm 3\%$ まで減少した。酸素プラズマ処理により、DLC の表面状態は、C=O peak が一様に $20 \pm 3\%$ 程度となり、いずれも Control と同等若しくはそれ以上の細胞増殖を促進する表面となった。なお、各 DLC において表面粗さを測定したところ、DLC によって数 nm~100 nm 程度のばらつきが確認されたが、これらの表面粗さによる直接的な細胞増殖への影響は見られなかった。

4. 考察

酸素プラズマにより各種 DLC 表面の C-C 結合または C-H 結合は、プラズマ中のラジカル、電子、イオンにより切断され、C-O、C=O、O=C-O などの酸化反応が促進したものと考えられる。カルボキシル基は一般的にマイナスにチャージアップし、アミノ基はプラスにチャージアップする。また、C=O 結合の割合が増加すると DLC 表面のゼータ電位が低下する。一般的に表面にカルボキシル基がある場合には H^+ が解離し、 COO^- となる。これにより、DLC 表面はマイナスに帯電することが知られている。これに起因して、カルボキシル基が増加するにつれ、酸素プラズマ処理前の DLC に比べ、ゼータ電位が低下していると考えられる。DLC 表面で官能基の量と種類を制御できれば、ゼータ電位制御が可能となり、特定の細胞を DLC 表面に選択的に付着または吸着抑制させることができると考えられる⁽⁷⁾。

5. まとめ

各種成膜手法により作製した DLC に対し、酸素プラズマ処理を施し、細胞増殖効果と表面状態の変化について検討した。同じ酸素プラズマ処理において、細胞増殖を抑制する DLC では、Control と同程度までの細胞増殖が顕著に“促進”された一方で、初めから細胞増殖を促進する DLC では、Control と同等まで細胞増殖が“抑制”された。酸素プラズマ処理は、DLC によっては細胞増殖を抑制する方向に作用するものの、各種 DLC に対し一様に Control と同等の細胞増殖性を付加できる表面処理技術として位置づけられる。

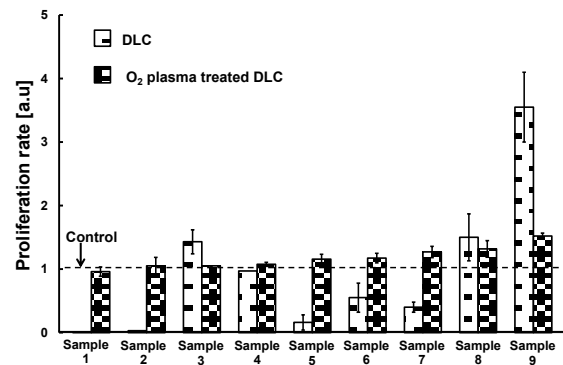


Fig.1 Result of cell growth on each O₂ plasma treated DLC.

Table 2 Surface condition of each O₂ plasma treated DLC

DLC sample	DLC C=O bond ratio [%]	O ₂ plasma treated DLC C=O bond ratio [%]
1	13.6	17.5
2	6.2	17.2
3	31.1	18.9
4	12.2	20.1
5	8.2	20.4
6	7.0	20.8
7	6.7	22.0
8	24.5	23.5
9	33.1	23.2

参考文献

- (1) 平栗健二, 尾関和秀, 大越康晴, 中村挙子, 小松直樹, 長谷部光泉, 鈴木哲也, 炭素系材料の将来予測-2050年に向けて-, NEW DIAMOND vol. 100, pp. 70-73, 2011.
- (2) 大竹尚登監修, DLCの応用技術, シーエムシー出版 2007.
- (3) 大越康晴, 平栗健二, 零二公雄, 五十川敬, 福井康裕, 天然繊維素材表面へ成膜した抗菌性DLC, NEW DIAMOND vol. 96, pp. 45-49, 2010.
- (4) 大越康晴, 平栗健二: 生体親和性評価, NEW DIAMOND vol. 106, pp. 41-44, 2012.
- (5) Mai Hibino, Yousuke Kimura, Yasuhiro Ohgoe, Azran Azhim, Sadamitsu Masuko, Masanori Hiratsuka, Hideki Nakamori, Hidetoshi Saitoh, Kazuhide Ozeki, Kenji K Hirakuri, Yasuhiro Fukui, Investigation of Relationship between DLC Film Deposition Methods and Surface Condition for Medical Applications, New Diamond Nano Carbons Conference, p23, 2012.
- (6) 金杉和弥, 大越康晴, 平栗健二, 舟久保昭夫, 福井康裕, DLC膜の細胞接着制御, 表面, vol.45, no12, pp.9-16, 2007.
- (7) 中谷達行, 岡本圭司, 新田佑樹, 望月明, DLC薄膜の生体医療機器への応用, NEW DIAMOND, vol.96, pp.64-68, 2010.