

論文の内容の要旨

論文題目

プラズマイオン注入/成膜法による生体機能性材料の創製に関する研究

氏名 横田 敏彦

1. 序論

腎不全患者への透析療法の一つである連続携行式腹膜灌流（CAPD）と呼ばれる治療法において、シリコンカテーテルは生体内において周辺組織と癒着せず、「トンネル感染」と呼ばれるカテーテル出口部での感染症や腹膜炎などの合併症を引き起こす要因となるため、医療現場で大きな問題となっている。生体組織接着剤にてカテーテルと周辺組織との接着が試みられているが、シリコンは接着剤の付着力も乏しく効果はあがっていない。この付着力が向上すれば、感染防止に効果的であることが予想される。またさらにシリコンは生体適合性に優れ医療用としての汎用性が高い反面、経年劣化も報告されており、単体では生体内で十分な長期安定化は困難である。本研究ではシリコンの表面改質によりこれらの問題を解決することを目的とし、その手法として三次元形状物に対してイオン照射及び膜堆積が可能なプラズマイオン注入/成膜（PBIID）法に着目した。イオン照射によるシリコンの表面改質および新たな層を形成することによる機能付加を行い、長期的にトンネル感染を防止するための新たな生体機能性材料の創製に向けての応用可能性について検討を行った。

2. 実験方法

ポリジメチルシロキサラン(C₂H₆SiO)_nが主成分である医療用シリコンシートを約 15mm × 15mmとなるように切り出したものを用いた。また本研究ではRF・高電圧パルス重畳方式PBIID装置を使用した。プラズマ生成ガスとしてHe・Ar・Krのいずれかを導入し、試料室の真空度は 10mTorrに設定し、試料に印加する負の高電圧パルスは 0～-10kV、室温にて処理を 30 分間行った。

また本研究ではシリコン表面へ機能付加するためのコーティング材として生体安全性、物理化学的安定性に優れる DLC（Diamond-Like Carbon）に着目した。しかし DLC 膜は作製方法や作製条件によって得られる膜の構造も特性も異なるため、PBIID 法にて作製した DLC の基礎的物性や細胞接着性およびこれらの関連性は明確ではない。そこでメタン、トルエン、窒素、水素を用いて PBIID 法にて作製した DLC の基礎的物性データ取得およびそれらの試料の細胞接着性評価も行った。

3. 表層物性解析手法

各種試料の組成はラザフォード後方散乱法(RBS)・弾性散乱検出分析法(ERDA)、X線光電子分光法(XPS)を用いて決定した。表面形状、表面官能基の種類、構成元素の結合状態、濡れ性は細胞接着挙動を左右すると考えられることから原子間力顕微鏡(AFM)、フーリエ変換赤外分光法(FT-IR)、水の接触角計を用いて調べた。さらに、炭素の構造を調べるため、マイクロラマン分光分析法(μ -RAMAN)を用いて評価した。

また、細胞接着挙動を評価するため、細胞接着状態を生体外観察した。用いた細胞はマウス由来の線維芽細胞(L929)である。この細胞と基材との接着を媒介するタンパク質を含むウシ胎児血清(FBS)を10%加えた培地中にL929を採取した後、培養は人間の体内を模擬したインキュベーター内で行った。細胞接着性の評価に関しては、L929が試料に接着しているか否かを細胞の形状により判断し、接着している細胞数の全細胞数に占める割合を細胞接着率として算出して評価に用いた。また、生体組織接着剤の付着力試験はヒト血清由来の生体組織接着剤を用いて接着面積が一定となるよう接着した後、せん断方向に引っ張り、剥離した時の荷重を測定して評価した。

4. 実験結果及び考察

PBII処理したシリコン試料は未処理のものに比べ、せん断方向付着力が約2~8倍と大幅に向上した。これについて下記のように考察した。

FT-IRの結果から、 CH_3 基などの分解がみられ、また切断された結合から新たにOH基・ >C=O 基などの結合が生成していた。疎水性である CH_3 基の分解と親水性のOH基の生成が見られたことから表面の親水化が示唆された。そこで、Ar処理した試料に関して接触角を測定した。未処理シリコンの接触角が 108° であったのに対し、PBII処理した試料の接触角は $103\sim 106^\circ$ であり、PBII処理したシリコン表面は親水化していた。ただし、 -10kV で処理した試料のみ接触角は 110° となり、表面は疎水化していた。さらに、表面形状の変化をAFMで観察した。シリコンの表面粗さ及び表面積が印加負電圧の増加に対して指数関数的に増加し、表面粗さは未処理シリコンに比べて最大約45倍増大した。これは結晶化している部分に比べて弱いアモルファス部分が、優先的にスパッタされたこと、および熱による収縮などによるものと考えられる^[1]。

これらの結果から、表面の親水化により生体組織接着剤の主成分となるタンパク質の表面への吸着量が増加したこと、および表面粗さの増加に伴うアンカー効果によって、生体組織接着剤の付着力が向上したと考えられる。

また、 -10kV で処理した試料のみ疎水化したのは、a-Cの顕在化および劇的に変化した表面形状効果が原因と考えられる。またラマン分光分析の結果から、この試料のみ顕著にa-C構造のピークが測定された。

PBII処理したシリコンの細胞接着率は大幅に向上し、未処理シリコンの細胞接着率が5割強であるのに対し、PBII処理した試料のうち大半が9割前後の細胞接着率となった。

これについて下記のように考察した。

FT-IRの結果から、Si-O結合、Si-C結合、CH₃基などの分解がみられ、また切断された結合から新たにSi-H結合・>C=O基などの結合が生成していた。これらの結合はタンパク質吸着サイトになるとの報告があり^[2]、本研究における細胞接着率向上もこれらの結合の増減が見られたことから、タンパク質の吸着量増加が考えられる。また表面の親水化による細胞接着タンパク質の活性化、さらには表面形状の変化などにも起因すると考えられる。また、処理電圧が高くかつ質量数の重いプラズマガスで処理した試料では細胞接着率が低下したが、これは表面が疎水化したためではないかと考えられる。次に、シリコンへ新たな層を形成し機能付加する前段階として、無機材料であるSiウェハーおよびシリカガラス上にPBIID法にてDLC膜の成膜を行った。そしてこれらのDLCについて構造解析と細胞接着性を調べた。

水素濃度はDLCの硬度などに影響するが、細胞接着性にも影響する可能性がある。そこで、メタンと水素を用いて水素濃度の異なるDLC膜を作製した。水素濃度を求めたところ16~48%の間で変化した。これらの試料について細胞接着率を評価したが約80%で試料間による差は見られなかった。よって細胞接着率は水素濃度に依存しないことがわかった。さらにラマン分光分析の結果から、パルス負電圧を上げていくとDLC中のグラファイト構造が減少することが分かったが、細胞接着率との相関関係はなかった。これらの結果はトルエンを用いても同様であった。

次に、トルエンを用いて成膜したDLCに対して、Ar⁺イオンを80kV、照射量：1E13~1E17 [ions/cm²]の範囲でイオンビーム照射を行った。照射により表面形状、組成、炭素の構造はほとんど変化しなかったが、FT-IRの結果から、照射量の増大に伴い、疎水性であるCH₃基の分解と表面OHの生成が確認され、接触角も77°から70°へ低下し親水化した。これに追従して細胞接着率も低下した。細胞接着に最適な接触角が存在するとの報告もあり^[3]、DLC膜の細胞接着率も接触角に依存することが示唆された。

次に、アミノ基の多い材料表面に細胞がより接着するとの報告があるため^[4]、トルエンを用いて窒素ドーピングDLCを作製し細胞接着性を評価した。組成分析の結果から最大で約2%程度の窒素ドーピングDLCが成膜でき、FT-IRの結果からもC-N、C-Nなどの結合が確認された。これらの試料に対して細胞接着率を評価したところ、細胞接着率は0.7%程度の窒素濃度まで正の相関関係があったが、それ以上の窒素濃度では約88%で一定となった。各試料の水の接触角を測定したところ、窒素濃度が高くなるにつれ68°から64°に低下した。これらはDLC表面のアミノ基とタンパク質のカルボキシル基が静電的に結合・吸着するため、0.7%の窒素濃度までは細胞接着率も増加するが、窒素濃度が0.7%以上になると表面が親水化し過ぎたため、最適な接触角から逸脱しタンパク質の吸着量が増加せず、細胞接着率は一定になったと考えられる。

5. 結論

PBIID法によるシリコンの表面改質によって、生体組織接着剤に対する付着力向上およ

び細胞接着率の大幅な向上が認められた。また、PBIID 法によって作製した DLC 膜は作製条件を適切に選択することで、生体材料として利用可能な膜であることが明らかとなった。これらの結果から、シリコンに表面改質および DLC コーティングを同時に施したハイブリッド型シリコンカテーテルの創製を提案した。

参考文献

- 【1】 M. M. Silvan et al., *Applied Surface Science* 235 (2004) 119-125
- 【2】 S. Suzuki et al., *Jpn. J Artif. Organs*, 16(3), 1341-1344 (1987) [in Japanese]
- 【3】 Y. Tamada et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 28, 783 (1994)
- 【4】 N.Faucheux et al., *Biomaterials*, 25, (2004) 2721-2730