Osaka University Knowledge Archive

Title	大気圧下低温プラズマ処理によるポリ乳酸の表面修飾とその細胞接着制御
Author(s)	中川, 正史
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/45156
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【21】

氏　　名	中川正史（なかがわまさふみ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　18592　号
学位授与年月日	平成16年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	**大気圧下低温プラズマ処理によるポリ乳酸の表面修飾とその細胞接着制御**
論文審査委員	（主査） 教　授　高橋　純造 （副査） 教　授　恵比須繁之　　助教授　中村　隆志　　講　師　十河　基文

論文内容の要旨

【研究目的】

生体組織工学（tissue engineering）は、適切な足場（scaffold）に細胞や生理活性物質を与え、生体組織や臓器の再生および再構築を行う医工学技術や方法論である。scaffold としての PLLA（ポリ乳酸）は、分解生成物のグリコール酸と乳酸が生体内の代謝産物として存在するために安全であり、強さや分解性は分子量、組成および結晶化度などを変えることにより制御できる特徴がある。しかし、足場材料としての PLLA は力学的強さや分解速度などを正確に制御する必要があるとともに、PLLA の側鎖には官能基がなく疎水性であるため、表面処理等により細胞との親和性を改善する必要がある。従来のプラズマ処理は、大型装置を必要とし簡便な表面処理方法ではないこと、またバルクにまで影響を及ぼす欠点が知られている。

本実験では、大気圧下での低温プラズマ処理装置を用いて PLLA 試料の表面処理を行い、MC3T3-E1 細胞と HeLa 細胞の細胞応答について検討した。プラズマ処理は大気圧中（Air）および各種ガス雰囲気中（CO_2、N_2、Ar、C_3F_8）で行った。

【研究方法】

1)試料の調整；試料は重量平均分子量（MW）が 20.4 万のポリ乳酸ペレット（ラクティー5000、PSPM1801、島津製作所）を 215℃のステンレスシリンダー内で 35 分間加熱溶融し、4℃に冷却した金型に射出成形機（スルフォンジェット 3000、ハイデンタルジャパン）を用いて射出成形して ϕ 15.6× 2 mm の細胞培養用円板試料を作製した。射出成形の条件は射出圧力 15 MPa、保圧 4 MPa（30 秒間）で行った。

2)表面処理；表面処理はプラズマ処理装置（Plasma Jet, Corotec）を用いて、大気中（Air）、二酸化炭素（CO_2）、窒素（N_2）、アルゴン（Ar）および八フッ化プロパン（C_3F_8）ガス雰囲気中で表面修飾を行った。プラズマ処理は試料電極間距離を 20 mm、試料の移動速度を 5 mm/sec とし、1または2往復行った。

3)表面分析

A. 表面観察；プラズマ処理前後の各試料表面性状（×100）を、超深度形状測定顕微鏡（VK-8500、KEYENCE）を用いて観察した。

B. 表面粗さ測定；プラズマ処理前後の各試料の表面粗さ（中心線平均表面粗さ；Ra）測定は、表面粗さ計（Surftest 201、ミツトヨ）を用いて行った。

C. 水との接触角測定；プラズマ処理前後の各試料表面の水との接触角（θ）は、接触角計（CA-X 型、協和界面科学）を用い、0.3μl の蒸留水を材料上に滴下して 10 秒後に測定した。

D. 表面自由エネルギー測定；表面自由エネルギー（γs）が既知の３種類の液（水、テトラブロモエタン、ジヨードメタン）と試料表面との接触角を接触角計を用いて測定し、プラズマ処理前後の試料表面の表面自由エネルギー（γs）およびその３成分を求めた。

E. XPS 分析；プラズマ処理前後の試料表面を全自動 X 線光電子分光装置（XPS-7000、理学電機）を用いて分析した。X 線は Mg Kα をターゲットとし、ワイドスキャンスペクトルは電流 5 mA、電圧 10 kV、ナロースキャンスペクトルは電流 10 mA、電圧 10 kV で測定した。得られたピークの波形分離を行い、原子数比、O/C 比および官能基を求めた。

4)細胞接着能試験；control（プラズマ未処理試料）および各種ガス中でプラズマ処理した PLLA 試料を、24 穴マルチウェルプレート（Coster, USA）の底面にセット後、5×10^5 個/ml に調整した MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞を播種し、１時間後の接着能について検討した。

5)細胞増殖能試験；control および各種ガス中でプラズマ処理した PLLA 試料を、24 穴マルチウェルプレートの底面にセット後、1×10^4 個/ml に調整した MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞を播種し、１および３日間の増殖能について検討した。

6)形態観察；control および Air プラズマ処理した PLLA 表面を、蛍光顕微鏡（TE-2000U, NICON）を用いて細胞の形態観察を行った。

【結果】

1)プラズマ処理した PLLA の表面修飾；Air、CO_2、N_2 および Ar プラズマ処理した PLLA 試料表面は、C1s 原子と C-H 結合が減少し、O1s 原子、O1s/C1s 比、C=O 基および表面自由エネルギー（γs）とその成分（γs^d、γs^h）の増加が認められた。C_3F_8 プラズマ処理した PLLA 試料表面は C-H 結合と表面自由エネルギー（γs）およびその成分（γs^d、γs^h）が減少し、疎水基（CF、CF_2O および CF_2^*）の生成が認められた。

2)プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞の接着能；Air、CO_2、N_2 および Ar プラズマ処理した試料上での MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞の接着能は control と比較して増加した。一方、C_3F_8 プラズマ処理した試料表面の MC3T3-E1 細胞の接着能は、Air、CO_2、N_2 および Ar プラズマ処理と比較して減少した。C_3F_8 プラズマ処理した試料表面の HeLa 細胞の接着能は、Air、CO_2、N_2 および Ar プラズマ処理した試料と比較して増加した。

3)ガス雰囲気中でプラズマ処理した試料表面での MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞の増殖能；Air、CO_2、N_2 および Ar プラズマ処理した試料表面での MC3T3-E1 細胞の増殖能（１、３日間）は control と比較して増加した。一方、C_3F_8 プラズマ処理した試料表面での細胞増殖能は control と比較して有意な差は認められなかった。Air プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞は、蛍光顕微鏡によると control と比較して良好に伸展していることが認められた。Air、CO_2、N_2 および Ar プラズマ処理した試料表面での HeLa 細胞の増殖能（１日後）は有意な差は認められなかった。一方、C_3F_8 プラズマ処理した試料表面の細胞増殖能は Air、CO_2、N_2 および Ar プラズマ処理した試料と比較して減少した。HeLa 細胞の増殖能（３日後）では、雰囲気ガスによる影響は見られなかった。

【結言】

大気圧下低温プラズマ処理装置を用いた scaffold（PLLA）の表面処理は、プラズマ処理する雰囲気ガスを変えることにより、細胞の接着制御が可能な臨床上有用な表面処理方法であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ポリ乳酸試料の細胞接着制御を目的に、低温プラズマ処理装置を用いて各種ガス雰囲気中で表面処理を行い、その表面性状変化および細胞応答について検討したものである。

その結果、Air、CO_2、N_2 および Ar 中でプラズマ処理した試料表面では、いずれも O1s/C1s が増加するとともに親水性になった。一方、C_3F_8 中でプラズマ処理した試料表面ではフッ化物が現れるとともに疎水性になった。また細胞の接着能はプラズマ処理により向上し、マウス骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞では前者のプラズマ処理の方が高く、ヒト子宮頸癌 HeLa 細胞では後者のプラズマ処理の方が高くなることを明らかにした。

以上のように本研究は、ポリ乳酸を再生医療用足場材料として使用する上で、低温プラズマ処理が細胞接着制御を可能にする有用で簡便な方法であることを提示するものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。