

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

博士論文

# 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

2004年2月提出

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔科学専攻・顎口腔機能再建学講座 先端顎口腔バイオマテリアル学分野

中川 正史

# 博士論文

# 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

# 2004年2月提出

大阪大学大学院歯学研究科 統合機能口腔科学専攻・顎口腔機能再建学講座 先端顎口腔バイオマテリアル学分野

## 中川 正史

# 目次

1.	緒 論	P 1-3
2.	大気圧下低温プラズマ処理による PLLA の表面修飾	
	2-1. 目 的	P 4
	2-2. 材料と方法	P 4
	2-2-1. 試料の調整	P 4
	2-2-2. 試料の洗浄	P 4
	2-2-3. プラズマ処理	P 5
	2-2-4. 表面分析	P 6-8
	2-2-5. 統計解析	P 8
	2-3. 結果	P 9-16
	・ プラズマ照射往復回数と PLLA 表面の表面性状との関係	<b>P 9</b>
	・ プラズマ処理前後の PLLA 表面の水との接触角	P 10
	・ Air プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触角の経時変化	P 10
	・ プラズマ処理前後の PLLA 表面の表面自由エネルギー	P 11
	・ プラズマ処理前後の PLLA 表面の XPS ワイドスキャンスペクトル	P 13
	・ プラズマ処理前後の PLLA 表面のナロースキャンスペクトル	P 14
	・ ナロースキャンスペクトルから求めた PLLA 表面の原子数比	
,	および O1s/C1s 比	P 16
	• ナロースキャンスペクトルから求めた PLLA 表面の	
	Cls 原子の結合状態	P 16
	2-4. 考察	P 17-25
	• Air, CO <sub>2</sub> , N <sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の水との	
	接触角と表面自由エネルギー成分との相関関係	<b>P 2</b> 1
	・ プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギー	
	およびその成分と原子数比や O1s/C1s 比との相関関係	P 23
	・ ブラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギー	<b>n</b>
	およびその成分と官能基との相関関係	P 23
	2-5. 結 論	P 26-27

3. 表面修飾した PLLA 表面での細胞応答

3-1. 目 的	P 28
3-2. 材料と方法	P 28
3-2-1. 使用材料	P 28
3-2-2. 試料の洗浄と滅菌	P 28
3-2-3. プラズマ処理	P 29
3-2-4. 細胞培養	P 29
3-2-5. 細胞接着能試験	P 29-30
3-2-6. 細胞増殖能試験	<b>P 30</b>
3-2-7. 形態観察	P 30
3-2-8. 統計解析	P 31
3-3. 結果	P 32
・ ガス滅菌による PLLA 表面の接触角変化	P 33
<ul> <li>プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の接着能</li> </ul>	P 33
<ul> <li>プラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の接着能</li> </ul>	<b>P 34</b>
・ 細胞培養1日および3日後のプラズマ処理した PLLA 表面での	
MC3T3-E1 細胞の増殖能	P 35
• 細胞培養1日および3日後のプラズマ処理した PLLA 表面での	
HeLa 細胞の増殖能	<b>P 36</b>
<ul> <li>細胞培養3日後のAirプラズマ処理したPLLA 表面での</li> </ul>	
MC3T3-E1 細胞の蛍光顕微鏡写真	<b>P 37</b>
3-4. 考察	P 38-46
・ 水との接触角と MC3T3-E1 細胞と HeLa 細胞の接着能との関係	<b>P 39</b>
• 表面自由エネルギーおよびその成分と細胞接着能との相関関係	P 41
・ 原子数比と細胞接着能との相関関係	<b>P 41</b>
・ 官能基と細胞接着能との相関関係	P 42
・ 表面自由エネルギー成分と細胞増殖能との相関関係	P 44
・ 原子数比と細胞増殖能との相関関係	<b>P 44</b>
・ 官能基と細胞増殖能との相関関係	P 44
3-5. 結 論	P 47-49
4. 結 言	<b>P</b> 50-51
5. 謝辞	P 52
6 文 敬	D 52 (1
	r 33-01

#### 1. 緒 論

生体組織に大きな欠損が生じた場合,人工的な scaffold(足場)を提供しなけ れば,組織の再生や再構築はほとんど不可能である.tissue engineering(生体 組織工学)は,適切な 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方法や医工学技術である.scaffold には無機や高分 子材料が使用され,その所要条件として以下のようなことが挙げられている<sup>1)</sup>. ①生体親和性を有する.②毒性や発ガン性がない.③抗原性が低い.④組織 形成に伴う生体内吸収性がある.⑤分解産物に毒性がない.⑥細胞との接着 性を有する.⑦細胞の活性を維持できる.⑧組織再生が可能な形態(多孔質) である.⑨再生完了期間まで安定性がある.⑩一定の機械的強度がある.

生体吸収性を有する合成高分子の scaffold としてはポリ乳酸(PLLA), ポリエ チレングリコール酸(PEG), ポリグリコール酸(PGA), ポリ ε -カプロラクトン (PCL)およびそれらの共重合体がある. これらの合成高分子は主鎖中の共有結 合が生体内に存在する水と酸素により加水分解や酸化分解により切断され低分 子化が起こる. ポリ乳酸は生体内の代謝産物である乳酸とグリコール酸に分解さ れるため安全であり, その分解性は材料の分子量や結晶化度および共重合比 などの組成により制御できる<sup>2,3)</sup>. そのため, 外科用縫合糸<sup>4,5)</sup>, 骨プレート<sup>6,7)</sup>, 骨 固定ピン<sup>8,9)</sup>, DDS(ドラッグデリバリーシステム)用マトリックス<sup>10,11)</sup>として臨床で 広く使用されている. しかし, PLLA の側鎖には官能基がなく疎水性であるため,

表面改質等により生体との親和性を改善する必要がある<sup>12)</sup>.

高分子の表面改質法としては湿式法と乾式法がある.湿式法には化学薬品 処理,プライマー処理,ポリマーコーティング処理,電着処理等がある<sup>13)</sup>.しかし, 乾燥工程が必要であり,薬品残留の影響が表面だけでなく,高分子の膨潤や 溶解によりバルクにまで影響を及ぼすことが報告されている<sup>13)</sup>.一方,乾式法に は放電処理,短波長UV(紫外線)処理,電子線処理,放射線処理およびサンド ブラスト処理等がある<sup>13)</sup>.放電処理は,放電時の気体圧力と電流密度によりさら にコロナ放電(高圧低温プラズマ),アーク放電(高圧高温プラズマ)およびグロ ー放電(低圧低温プラズマ)に分類される<sup>14)</sup>.プラズマとは与えられたエネルギ ーにより気体原子や分子が励起されて電子を放出し,電離した正イオンと電子 がほぼ等しい密度となって,全体として中性の状態をいう<sup>15)</sup>.

プラズマ処理では,雰囲気ガスを変えることにより高分子試料表面を物理的 あるいは化学的に変化させることができる<sup>16,17)</sup>. プラズマ処理に使用するガスは, He や Ar などの化学反応しない不活性ガスと,H<sub>2</sub>,O<sub>2</sub>,N<sub>2</sub>,NH<sub>3</sub> および CF<sub>4</sub>のよ うな化学反応する活性ガスとがある.

歯科領域でのプラズマ処理を応用した表面改質は,印象の表面処理<sup>18</sup>,アク リルレジンの濡れ性の向上<sup>19</sup>,インプラントの表面改質<sup>20-22)</sup>および歯科用器具 の殺菌<sup>23)</sup>などに幅広く臨床応用されている.一般的な(広く使用されている)プ ラズマ装置は減圧真空下で処理するため大型装置を必要とし,バルクにまで影 響を及ぼす可能性もある.

本実験では、大気圧下で簡便に表面処理が可能な低温プラズマ処理装置を 用いて、細胞接着性の制御を目的とし MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細 胞)および HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の細胞応答を検討した. 第1部では 大気圧中(Air)および CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>のガス雰囲気中でプラズマ処理した PLLA の表面性状観察、表面粗さ、水との接触角、表面自由エネルギー、表面 元素および表面の官能基について検討した. 第2部ではプラズマ処理前後の PLLA 試料表面での細胞接着能や細胞増殖能などの細胞応答について検討し た.

# 2. 大気圧下低温プラズマ処理による PLLA の表面修飾

#### 2-1. 目的

PLLA 表面を大気中および雰囲気ガス中でプラズマ処理を行い,その処理条件と表面修飾との関係を明らかにすることが目的である.

#### 2-2. 材料と方法

2-2-1. 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 -5000, PSPM1801, 島津製作所, 日本)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, 日本)を用いて射出成形して φ 15.6×2mm の細胞培養用円板試料を作製した. 射出成形は射出圧力 15MPa, 保圧 4MPa の条件で 30 秒間行った.

2-2-2. 試料の洗浄

成形した PLLA 試料は蒸留水中で超音波洗浄を10分間行った後,自 然乾燥させ,使用するまで 23℃のデシケータ内に保存した. 2-2-3. プラズマ処理

プラズマ処理装置とプラズマ処理条件を図1および図2に示す. PLLA 試料は図1に示すプラズマ処理装置(Plasma Jet, Corotec, USA)を用い て,大気中(Air)および二酸化炭素(CO<sub>2</sub>),窒素(N<sub>2</sub>),アルゴン(Ar)お よび八フッ化プロパン(C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)ガス雰囲気中で表面修飾を行った.以下, Air プラズマ, CO<sub>2</sub>プラズマ, N<sub>2</sub>プラズマ, Ar プラズマ, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマと略 称する.また,プラズマ処理していない試料を control とした.プラズマ処 理は試料電極間距離を 20mm, 試料の移動速度を 5mm/sec とし, 1 また は2 往復行った(図 2).



図 1. プラズマ処理装置



# 図 2. プラズマ処理装置の構成図と プラズマ処理条件

2-2-4. 表面分析

1) 表面観察

プラズマ処理前後の各試料表面は超深度形状測定顕微鏡(VK-8500、

KEYENCE, 日本)を用いて表面性状(×100)の観察を行った.

2) 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)は, 表面粗さ計(Surftest 201, ミツトヨ, 日本)を用いて行った.

3) 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は,接触角計(CA-X型,協和界面科学,日本)を用い,0.3μ0の蒸留水を材料上に滴下して10秒後に接触角(θ)を測定した.

4) 表面自由エネルギー測定

表面自由エネルギー( $\gamma$ s)が既知の3 種類の液(水, テトラブロモエタ ン, ジョードメタン)<sup>24)</sup> と試料表面との接触角を接触角計(CA-X型,協 和界面科学,日本)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( $\gamma$ s)を求めた.表面自由エネルギーの測定は以 下に示す手順に従って求めた.先ず,各液を試料上に $0.3 \mu \ell$ 滴下して, 10 秒後に接触角( $\theta$ sL)を測定した.次に,測定接触角と各液体の表 面自由エネルギーの値(表1)を①式のYoung-Dupreの式に代入し,液 体とPLLA 試料表面の付着エネルギー(WsL)を求めた.  $W_{SL} = \gamma_L (1 + \cos \theta_{SL})$ ; Young-Dupre  $\mathcal{O} \ddagger - 1$ 

また、W<sub>SL</sub>は、液体とPLLAの各表面自由エネルギー成分からなる② 式で表される.

 $W_{SL} = 2(\gamma_{S}^{d} \cdot \gamma_{L}^{d})^{1/2} + 2(\gamma_{S}^{p} \cdot \gamma_{L}^{p})^{1/2} + 2(\gamma_{S}^{h} \cdot \gamma_{L}^{h})^{1/2} - 2$   $\gamma_{L}^{d}, \gamma_{L}^{p}, \gamma_{L}^{h}$ は各液体の表面自由エネルギーの分散成分,双極子 成分,水素結合成分である.3種類の液との接触角( $\theta_{SL}$ )から①式よ り求めた各  $W_{SL}$ の値を, ②式に代入した3元1次連立方程式から, 試 料の3成分 ( $\gamma_{S}^{d}, \gamma_{S}^{p}, \gamma_{S}^{h}$ )の値を算出した. PLLA の表面自由 エネルギー( $\gamma_{S}$ )はその値を③式(拡張 Fowkes の式)に代入して3成 分の総和として求めた.

 $\gamma_{s} = \gamma_{s}^{d} + \gamma_{s}^{p} + \gamma_{s}^{h}$ ; 拡張 Fowkes の式 -- ③ ここで,  $\gamma_{s}^{d}$ ,  $\gamma_{s}^{p}$ ,  $\gamma_{s}^{h}$ は PLLA の表面自由エネルギーの分散成分, 双極子成分, 水素結合成分である.

Liquida —	Surface free energy (mJ/m <sup>2</sup> )			
	γs	γs <sup>d</sup>	$\gamma s^p$	$\gamma s^h$
water	72.8	29.1	1.3	42.4
tetrabromoethane	47.5	44.3	3.2	0.0
diiodomethane	50.8	46.8	4.0	0.0

表1. 使用した3成分の表面自由エネルギー 24)

5) XPS 分析

プラズマ処理前後の試料表面は全自動 X 線光電子分光装置 (XPS-7000,理学電機,日本)を用いて分析した.励起X線はMgKa を供給源とし,ワイドスキャンスペクトルは電流 5mA,電圧 10KV,ナロ ースキャンスペクトルは電流10mA,電圧10KVで測定した.また,測定 前後で標準試料(Ag)に対する装置の検出感度の補正後,Pass energy 15eV および Step energy 0.1eV の条件で測定を行った.得られたピー クの波形分離を行い,原子数比,O1s/C1s比および官能基(結合状態) を求めた.

2-2-5. 統計解析

得られたデータの各平均値および標準偏差を求め,分散分析

(ANOVA)により有意差検定後, Fisher の多重比較検定を行い, 有意 水準 5%で統計処理した. 相関係数および p 値は Spearman の順位相 関により危険率(p<0.05)を求めた. 表および図中の異なるアルファベ ットは有意差があることを示す. また, 相関性の表現は, 相関係数 0.7 ~1 では強い順相関, 相関係数 0.4~0.7 は弱い順相関, 相関係数 -0.4~0.4 は相関なし, 相関係数-0.4~-0.7 は弱い逆相関および相 関係数-0.7~-1 は強い逆相関とする<sup>25)</sup>.

## 2-3. 結果



図 3. プラズマ照射往復回数と PLLA 表面の表面性状との関係(×100)

プラズマ処理前後のPLLA 表面の水との接触角を図4に示す. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の接触角は control と比較して有意に減 少した (p<0.01). N<sub>2</sub> や Ar プラズマ処理した PLLA 表面の接触角は Air や CO<sub>2</sub> プラズマ処理試料よりも有意に大きくなった(p<0.01). 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理 した PLLA 表面の接触角は, control と比較し有意に増加した(p<0.01).

Air プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触角の経時変化を図5に示す. control の接触角は約80°で, Air プラズマ処理直後の接触角は約38°まで有 意に減少した(p<0.01).時間経過とともに接触角は徐々に増加し,90日後には 約70°まで回復した(p<0.01).



図 4. プラズマ処理前後の PLLA 表面の水との接触角



図 5. Air プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触角の経時変化

プラズマ処理前後の PLLA 表面の表面自由エネルギーを図 6 に示す. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギー( $\gamma$ s) の分散成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>)と双極子成分( $\gamma$ s<sup>p</sup>)は controlと比較してほとんど変化が見ら れなかったが,水素結合成分( $\gamma$ s<sup>h</sup>)は control と比較して著しく増加した. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギー( $\gamma$ s)とその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>p</sup>および $\gamma$ s<sup>h</sup>)は control と比較して減少した.



図 6. プラズマ処理前後の PLLA 表面の表面自由エネルギー

プラズマ処理前後の PLLA 表面の XPS ワイドスキャンスペクトルを図 7 に示 す. control および Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar プラズマ処理した PLLA 表面には C1s (285eV), N1s(400eV)および O1s(532eV)の 3 つのピークの内 2 つのピークが 観察された. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面では 3 つのピーク以外に F1s(689eV)ピークが観察された. プラズマ処理前後の PLLA 表面のナロースキャンスペクトルを図 8 に示す. control および Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar プラズマ処理した PLLA 表面では C-H (285.0eV), C-O(286.6eV), C=O(287.9eV)および COO(289.1eV)の 4 つのピ ークに分離された. C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面では C-H(285.0eV), C-O (286.6eV), C=O と CF は同ピーク位置(287.9eV), COO(289.1eV), CF<sub>2</sub> (290.8eV)および CF<sub>2</sub>O(292.3 eV)に分離された. 得られたピークの波形分離を 行い, ピーク面積から原子数比, O1s/C1s 比および官能基(結合状態)を求め た.



図 7. プラズマ処理前後の PLLA 試料表面の XPS ワイドスキャンスペクトル a) control, b) Air plasma, c) CO<sub>2</sub> plasma, d) N<sub>2</sub> plasma, e) Ar plasma, f) C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> plasma



図 8. XPS 分析のナロースキャンスペクトル

a) control, b) Air plasma, c) CO<sub>2</sub> plasma, d) N<sub>2</sub> plasma, e) Ar plasma, f) C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> plasma

ナロースキャンスペクトルから求めた PLLA 表面の原子数比および O1s/C1s 比を表 2 に示す. N1s 原子数は control と比べて Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した PLLA 表面では増加したが, Arプラズマ処理した PLLA 表面 では減少した. O1s 原子数は control と比べて Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズ マ処理した PLLA 表面では増加したが, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面では 減少した. 一方, C1s 原子数は control と比べて Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar および C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した全ての試料表面で減少した. F1s 原子数は C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理 した PLLA 表面で増加した. O1s 原子数とC1s 原子数は C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理 した PLLA 表面で増加した. O1s 原子数とC1s 原子数の比 (O1s/C1s 比) は C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理以外の全てのガスで増加し, CO<sub>2</sub>プラズマ処理した PLLA 表面が 最も大きくなった. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面では control とほぼ 同じ値を示した.

ナロースキャンスペクトルから求めた PLLA 表面の C1s 原子の結合状態を表 3 に示す. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar ガス中でプラズマ処理した PLLA 表面は, control と比較して C=O 基が増加した. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面 では control と比較して, C-H 結合は減少し CF(287.9eV), CF<sub>2</sub>(290.8eV)およ び CF<sub>2</sub>O(292.3eV)などのフッ化物の存在が確認された.

Gas		ntage (%)			
	N1s	O1s	C1s	F1s	Ols/Cls
Control	1.02	45.10	53.88		0.84
Air	4.82	50.54	44.64		1.13
$CO_2$	3.48	52.25	44.27		1.18
$N_2$	2.65	49.15	48.20		1.02
Ar	0.52	48.51	50.97		0.95
C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	1.90	27.39	32.25	38.46	0.85

表2. ナロースキャンスペクトルから求めたPLLA表面の原子数比およびO1s/C1s比

.

表3. ナロースキャンスペクトルから求めたPLLA表面のC1原子の結合状態

Gas	s Functional group (%)						
Ous	COO	C=O	C-O	С-Н	CF	CF <sub>2</sub> O	CF <sub>2</sub>
Control	29.35	4.96	28.11	37.58			
Air	32.04	11.25	28.39	28.33	_		_
$CO_2$	32.64	11.26	24.15	31.95		—	_
$N_2$	27.18	10.90	26.39	35.54		—	
Ar	27.53	12.97	22.62	36.89		_	
C <sub>3</sub> F <sub>8</sub>	33.52	(5.55)	19.72	19.49	(5.55)	2.68	19.04

.

#### 2-4. 考察

scaffold の試料形状は,強さ,分解速度,成形性および細胞接着性などと密 接な関係にあり,目的組織や欠損部位に応じて異なる.試料の形状には,シー ト,チューブ,スポンジ,不織布,メッシュ,編織物および高次成形体などがある. その成形法にはシートやチューブの場合には押し出し,プレスおよびキャストが あり,スポンジの場合には凍結乾燥,発泡,相分離,ポローゲン溶出および焼 結があり,不織布の場合にはスパンボンド,メルトブロー,ニードルパンチおよび メッシュがあり,編織物の場合には紡糸があり,高次成形体の場合には光造型 およびレーザー加工などがある<sup>28-33)</sup>.これらの多くは既に多孔質体に成形され ているため,細胞接着能の影響を正確に把握できないのが現状である.そのた め,本実験では,多孔質体試料では定量分析できない要因を射出成形法によ りバルク試料を製作して検討した.

ポリ乳酸は分解産物である乳酸とグリコール酸が生体内の代謝産物として存 在するため安全であり、その分解性は材料の分子量、結晶化度および共重合 比などの組成により制御できる特徴がある。そのため、ポリ乳酸は目的組織や 欠損部位に応じて臨床応用される範囲が広いと考えられるため、実験材料とし て選択した.

本実験に用いたプラズマ照射装置は、パワーユニットと放電用電極とから構成されており 120V の電圧で可動する. プラズマ処理は低圧の気体に電圧をか

けると、大気中に少量存在している自由電子が加速され、大きな速度で移動し 始める.この加速された電子が付近に存在する原子や分子に衝突し、原子や 分子がイオン化されてラジカルを生成する<sup>18)</sup>.このラジカルは雰囲気に存在す るガス(活性ガス)または放電雰囲気から試料を取り出した後に曝される空気 (不活性ガス)と接触することにより表面に新しい官能基が生成する.官能基の 種類は放電雰囲気に存在するガスの種類に依存しており、ガスの種類を変える ことにより親水性や疎水性の異なった表面特性を付与することができる<sup>34)</sup>.

プラズマガスの種類はCO2, N2およびC3F8などのような活性ガスやArなどの 不活性ガスがある. C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> ガスはフッ化炭素ガス中でもオゾン層の破壊の危険性 が少なく,また人体に対しても比較的安全なガスであり,反応性ガスプラズマと して表面を疎水化する場合に使用されている 35,36). フッ化炭素は反応性(重合 性)の違いにより従来から2つに分類されている.1つは不飽和(あるいは環状) フッ化炭素でプラズマ中で重合し,他の1つは飽和フッ化炭素で化学的に反応 するが重合しない.フッ化炭素の重合性は分子中の炭素とフッ素の比によって 決まり, F/C が 2.5 より大きい C3F8 などは重合しにくく, 小さいものは飽和フッ化 炭素でも重合する<sup>37)</sup>. 重合性と非重合性の境界付近に存在する C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>(F/C) =2.67 ガス中でのプラズマ処理は, PLLA 表面で重合が進行すると同時に分子 鎖の切断が起こり、フッ化物が生成したものと考えられる<sup>38)</sup>. 一方, Ar のような 不活性ガス中でプラズマ処理を行った場合には,化学反応は起こらないが励 起された原子は PLLA 表面で物理的に反応する. 以上のことより, ガスの主な

役割は,不活性ガスではスパッタエッチングや洗浄目的であり,活性ガスはエッ チングに有効であると考えられる.

本装置は、従来の装置と比較して経済性が低く、小型装置で大気中による簡 便な表面修飾が可能であり、試料のバルクにまで影響を及ぼすことは少ない. しかし、本実験では、プラズマ処理を2往復行った PLLA 試料表面は、表面粗 さや表面観察から、プラズマ処理を1往復行った試料と比較して荒れていた(図 3). プラズマ状態は、電子温度と気体温度が一致して熱平衡が成立した場合 (熱プラズマ)や気体温度が常温またはこれに近い温度でも強い電磁場の中で 高温(10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup>K)の電子が動き回っている場合(低温プラズマ)に達成される<sup>14)</sup>. 従って、1往復のプラズマ処理では、試料表面の発熱は起こらないが、2往復の プラズマ処理では、試料表面に衝突したプラズマにより発熱が起こり、試料表面 の一部溶融が起こったものと考えられる. 細胞接着能は試料の表面粗さに影響 されるという報告があるので、表面粗さが control と比較してほとんど変化のない 1往復のプラズマ処理を以後の実験条件とした.

プラズマ処理前後の PLLA 表面の定量分析は, XPS, 濡れ性および表面自 由エネルギーを用いて行った. XPS 分析は, 高真空条件下で X 線を照射する ため測定までに時間を要し, 高分子表面の分子構造に影響を及ぼす可能性は あるが, 材料の極く表面の定量分析を行うのには優れた装置である<sup>39)</sup>. 一方, 濡れ性や表面自由エネルギーの表面測定は, 操作が簡単で測定時に高分子 に影響を与えることは少ない. 表面自由エネルギーとは表面張力のことであり.

分子間力に働く力のことをいう. その分子間力は 3 種類(分散成分, 双極子成 分, 水素結合成分)の成分があり, これらの力の合算力である<sup>40)</sup>. 分散成分とは 一方の分子中で電子の電荷分布に時間的揺らぎが起こり, 電気双極子などの 多重極が一時的にできる. これが, 他方の分子に多重極を誘起して両方の間 に働く引力をいう. 双極子成分は最初から電気双極子をもつ分子での, 極性結 合成分である. 水素結合成分は水素原子より電気的に陰性原子が水素原子を 介して弱く結びつく結合である<sup>41)</sup>. 表面自由エネルギーの測定は, これまで分 散成分と双極子成分の 2 成分による分析が一般的に行われてきたが, 極性物 質どうしの組合せや水素結合をもつような物質間の相互作用を正しく評価する ことは困難であった<sup>24)</sup>. しかし, 最近は分散成分, 双極子成分および水素結合 成分の 3 成分による評価が可能になった<sup>42)</sup>.

Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触角は, control(未処理)と比較して小さくなり, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面の水と の接触角は, control と比較して大きくなった(図 4). このことから, プラズマ処理 した PLLA 表面の濡れ性を, ガスの種類を変えることにより制御することが可能 であることが示された. しかし, Air プラズマ処理した PLLA 表面は保存時間とと もに, 接触角が大きくなり, 濡れ性は低下した(図 5). これは, 保存時に大気中 に存在する炭素化合物などが PLLA 表面へ吸着したことによるものと考えられる <sup>43)</sup>. 既知の 3 種類の液との接触角から求めた PLLA 表面の表面自由エネルギ  $-(\gamma s)$ は, Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面では control

と比較して高くなり、表面自由エネルギー成分( $\gamma_s^h$ )の増加が顕著に認められた. 一方、 $C_3F_8$ プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギーは control と比較して減少し、Air、CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギー( $\gamma$ s)とは逆の結果が得られた(図 6).

Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触角と表面 自由エネルギー成分との相関関係を表 4 に示す.分散成分( $\gamma s^d$ )および水素 結合成分( $\gamma s^h$ )と接触角との間には強い逆相関が見られた(p<0.01).このこと から,接触角の減少つまり表面自由エネルギー( $\gamma s$ )の増加は,主に分散成分 ( $\gamma s^d$ )と水素結合成分( $\gamma s^h$ )に関係があることが示された.

表4. PLLA表面の水との接触角と表面自由エネルギー成分との相関関係

Surface free energy	Correlation coefficient
$\gamma s^d$	-0.818**
γs <sup>p</sup>	-0.021
γs <sup>h</sup>	-0.966**
	*;p<0.05 **;p<0.01

XPS 分析では、Air、CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面は、C1s が減少しO1s やO1s/C1s 比が増加した.特に Air、CO<sub>2</sub> プラズマ処理した PLLA 表面は、他のガスと比較し O1s や O1s/C1s 比の増加率は高かった.これは、O 原子を含む雰囲気でプラズマ処理を行ったことによるものと考えられる.一方、 C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した PLLA 表面では F1s が増加した(図 8、表 2).これは、F 原子を含む雰囲気でプラズマ処理を行ったことによるものと考えられる. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar ガス中でプラズマ処理した PLLA 表面は, C=O 基が増加し C-H 結合は減少した. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した PLLA 表面では CF, CF<sub>2</sub> および CF<sub>2</sub>O などのフッ化物が増加した(図 8, 表 3).

プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギーおよびその成分と原子 数比やO1s/C1s 比との相関係数を表 5 に示す. 表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およ びその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)と C1s 原子との間には強い逆相関(p<0.01)が見られ, 表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)と O1s 原子や O1s/C1s 比との間には強い順相関(p<0.01)が見られた. このことから, PLLA 表面の C1s 原子が増加すれば表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)が 減少し, O1s 原子や O1s/C1s 比が増加すれば表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およ びその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)が増加することがわかった.

プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギーおよびその成分と官能 基との相関係数を表 6 に示す. Air および各種ガス中でプラズマ処理した試料 では表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>h</sup>)と C=O には弱い順相関 (p<0.01)が見られ,表面自由エネルギー成分( $\gamma$ s<sup>p</sup>)と C-H 結合との間には強 い順相関(p<0.01)が見られた. このことから,表面自由エネルギー( $\gamma$ s)および その成分( $\gamma$ s<sup>h</sup>)が増加すると C=O の官能基が増加し, $\gamma$ s<sup>p</sup> 成分が増加すると C-H 結合が増加することがわかった.

Surface free energy	Atomic percentage (%)			
Surface free energy	N1s	O1s	C1s	Ols/Cls
$\gamma_{\rm s}$	0.600*	0.943**	-0.886**	0.886**
γs <sup>d</sup>	0.314	0.771**	-0.714**	0.714**
$\gamma s^p$	-0.543*	-0.086	0.371*	<b>-0.37</b> 1 <sup>*</sup>
γs <sup>h</sup>	0.667**	0.928**	-0.927**	0.928**
			*;p<0.05	**;p<0.01

表5. プラズマ処理したPLLA表面の表面自由エネルギー およびその成分と原子数比やOls/Cls比との相関係数

表6. プラズマ処理したPLLA表面の表面自由エネルギー およびその成分と官能基との相関係数

		Function	nal group (%	5)
Surface free energy	COO	C=0	C-0	С-Н
γs	-0.086	0.600**	0.029	-0.143
$\gamma s^d$	-0.486*	0.429	0.086	-0.029
$\gamma s^p$	-0.486*	0.086	0.371*	0.829**
$\gamma s^h$	0.000	0.638**	-0.058	-0.290
			*	5 **

\*;p<0.05 \*\*;p<0.01

濡れ性の向上は洗浄効果,活性効果および粗面効果の3効果で起こる. 洗浄効果とは,照射表面に付着している有機物(汚れ)にプラズマ粒子が 結合し分解除去されることである.活性効果は濡れにくい表面をプラズマ 粒子によりその濡れ性を改善することである.粗面効果とは,プラズマ粒 子により PLLA 表面に原子レベルの凹凸を形成することである<sup>44)</sup>. XPS からは、プラズマ処理した試料表面は、C-H 結合が減少し、新たにカルボ キシ基(COOH)や水酸基(OH)などの官能基が形成され、表面の洗浄 効果と活性効果が確認できた(表 3). PLLAの表面観察からは、プラズ マ処理を2往復行うことにより粗面効果が確認できた(図 3).

プラズマ照射により放出される電子エネルギーは約 5eV であり, PLLA の原 子間単結合の結合エネルギーである3.6~4.3eVより大きい<sup>15)</sup>. プラズマが衝突 した PLLA 表面は, 表面に存在する C-H 結合の切断や汚染炭化水素の洗浄に よりラジカルの発生が起こり, このラジカルが CO<sub>2</sub> や N<sub>2</sub>のような活性ガスと反応 することによりカルボキシ基 (COOH) や水酸基 (OH) などの親水性の官能 基が生成したことによるものと考えられる. 一方, Ar のような不活性ガスでプラズ マ処理した PLLA 表面でも, プラズマ処理後に試料を取り出した時に空気と接 触して反応する. その結果, PLLA 表面にはカルボキシ基 (COOH) や水酸基

(OH) などの親水性の官能基が形成したことによるものと考えられる. C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラ ズマ処理した PLLA 表面は, CF, CF<sub>2</sub>および CF<sub>2</sub>O などの疎水性のフッ化物が 表面に形成したことによるものと考えられる.

以上のことから、Air、CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面 は、親水性のカルボキシ基(COOH)や水酸基(OH)が形成されること により、表面自由エネルギー( $\gamma$ s)および水素結合成分( $\gamma$ s<sup>h</sup>)が増加し、 接触角が減少したものと考えられる(図 9).また、C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理し た PLLA 表面には、疎水性のフッ化物が形成されることにより、表面自由

エネルギー(γs)および水素結合成分(γs<sup>h</sup>)が減少し,接触角が増加した ものと考えられる(図 10).

•



図 9. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理による

PLLA 表面の官能基形成の模式図



図 10. C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理による PLLA 表面の官能基形成の模式図

## 2-5. 結 論

本研究では、PLLA表面を大気中および雰囲気ガス中でプラズマ処理を行い、 その処理条件と表面修飾との関係を明らかにした結果,以下の結論を得た.

1. プラズマ処理後および保存期間の影響

Air プラズマ処理した PLLA 表面の濡れ性は向上したが,保存期間とともに低下した.

2. <u>Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理</u>

Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面は, 1) C1s 原子と C-H 結合が減少し, 2) O1s 原子, O1s/C1s 比, C=O 基および表面自由エネルギ ー ( $\gamma$ s)とその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)の増加が認められ濡れ性が向上した.

3. C3F8 プラズマ処理

C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した PLLA 表面は, 1)C-H 結合と表面自由エネルギー (γs)およびその成分(γs<sup>d</sup>, γs<sup>h</sup>)が減少し, 2)疎水基(CF, CF<sub>2</sub>O)の生成 が認められ濡れ性が低下した.

4. 接触角(水)と表面自由エネルギーとの相関関係

接触角と表面自由エネルギー(ys)およびその成分(ys<sup>h</sup>, ys<sup>d</sup>)との間には 強い逆相関が認められた.

# 5. 表面自由エネルギーと原子数比との相関関係

.

表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)とO1s, O1s/C1s比との間には強い順相関が認められた. 一方, 表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)とC1sとの間には強い逆相関が認められた.

## 3. 表面修飾した PLLA 表面での細胞応答

#### 3-1. 目的

大気中(Air)および雰囲気ガス(CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)中でプラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)や HeLa 細胞(ヒト子 宮頸ガン細胞)の細胞接着能, 細胞増殖能および形態観察について検討し, 濡れ性, 表面自由エネルギー, 表面原子および官能基の種類や量と細胞応答 との関係を明らかにすることが目的である.

#### 3-2. 材料と方法

3-2-1. 使用材料

細胞実験用試料は実験 I と同じ条件で φ 15.6×2mm の円板試料を製作した.

3-2-2. 試料の洗浄と滅菌

ポリ乳酸試料は, 蒸留水中での超音波洗浄を 10 分間行った後, 自然 乾燥させ 23℃のデシケータ内に保存した. 試料の滅菌はエチレンオキサ イドガス滅菌装置(SEMMEL 601-MDX, ジェーエムシー医器研, 日本) を用いて55℃で8時間の条件で行った. 滅菌後の試料は, 23℃のデシケ

ータ内にて保存した.

3-2-3. プラズマ処理

実験 I と同じ条件で行った.

3-2-4. 細胞培養

細胞は MC3T3-E1(マウス骨芽細胞様細胞)および HeLa 細胞(ヒト子 宮頸ガン細胞)を用い、37℃の 5%二酸化炭素・95%空気中で組織培養 用ポリスチレンフラスコ(PS, Coster, USA)中で培養した. 培地は、10% FBS(Valley biomedical,日本)、50U/mlペニシリンストレプトマイシン(PS, Sigma, UK)を添加したメディウム(DMEM, GIBCO, USA)を用いて培養 した. 培養した MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞は、0.25%トリプシン EDTA(TE, GIBCO, Canada)を用い3分間のトリプシン処理を行った後、 フラスコから回収した. その後、血球計算板で細胞数をカウントし、必要 濃度に調整した.

3-2-5. 細胞接着能試驗

細胞接着能試験は control, Air プラズマ,  $CO_2$ プラズマ,  $N_2$ プラズマ, Ar プラズマおよび  $C_3F_8$ プラズマ処理した試料を 24 穴マルチウェルプレート(Coster, USA)の底面にセット後,  $5 \times 10^5$  個/m  $\ell$ に調整したMC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞を播種し,  $37^{\circ}$ Cの 5%二酸化炭素・95%空気中で 1 時間培養した. その後, 上清を吸引し, 0.04%クリスタルバイオレット溶液( $100 \mu \ell$ )で室温にて 10 分間染色し, リン酸緩衝液

(PBS, GIBCO, Canada) および蒸留水にて各 3 回洗浄した. その後, ジメチルスルホキシド(DMSO, WAKO, 日本)(20µ0)で細胞を溶解後,
室温で 10 分間放置し, 蒸留水を 80µ0加え, マイクロプレートリーダー
(MTP-32, CORONA electric, 日本)を用いて, 検査波長 590nm と対照
波長 490nm との吸光度差を測定した.

3-2-6. 細胞増殖能試験

細胞増殖能試験は control および Air プラズマ,  $CO_2$  プラズマ,  $N_2$  プラ ズマ, Ar プラズマおよび  $C_3F_8$  プラズマ処理した試料を 24 穴マルチウェ ルプレートの底面にセット後, 1×10<sup>4</sup> 個/m0に調整した MC3T3-E1 細胞 および HeLa 細胞を播種し, 37℃の 5%二酸化炭素・95%空気中で 0~3 日間培養した. その後, WST assay により WST 試薬溶液(Cell counting kit8, WAKO, 日本)を 10  $\mu$  0 ずつ添加し, 炭酸ガスインキュベーター内 で2時間呈色反応を行い, マイクロプレートリーダーを用いて波長 630nm と415nm との吸光度差を測定した.

3-2-7. 形態観察

control および Air プラズマ処理した PLLA 表面は蛍光顕微鏡 (TE-2000U, NIKON, 日本)を用いて 200 倍で観察し, 得られたデータを 蛍光画像解析システム(Lumina Vison, MITANI, 日本)を用いて解析を 行った. 3-2-8. 統計解析

得られたデータの平均値および標準偏差を求め,分散分析 (ANOVA)により有意差検定後,Fisher の多重比較検定を行い,有意 水準 5%で統計処理した.相関係数および p 値は Spearman の順位相 関により危険率(p<0.05)を求めた.異なるアルファベットは有意差があ ることを示す.また,相関性の表現は,相関係数 0.7~1 では強い順相 関,相関係数 0.4~0.7 は弱い順相関,相関係数-0.4~0.4 は相関な し,相関係数-0.4~-0.7 は弱い逆相関および相関係数-0.7~-1 は 強い逆相関とする<sup>25)</sup>.

#### 3-3. 結果

細胞応答試験を行う前に、ガス滅菌がプラズマ処理前後での PLLA 表面の 濡れ性に及ぼす影響を検討した. ガス滅菌による PLLA 表面の接触角変化を 図 11 に示す. control(プラズマ未処理 PLLA 試料)の接触角は、12 時間の保 存中に行ったガス滅菌(所要時間;8 時間)を経て 12 時間後に有意に増加した が、24 時間後には回復した(p<0.05)(図 11-①).また、Air プラズマ処理後の PLLA 試料の接触角は、上記と同様にガス滅菌を行うと有意に増加した (p<0.05)(図 11-②). Air プラズマ処理後にガス滅菌を行うと有意に増加した 試料の接触角は、ガス滅菌を行った場合と比較して有意に低く、ガス滅菌の影 響があることがわかった(図 11-③). これらのことから、以後の実験ではガス滅菌 の影響に左右されないようにガス滅菌後にプラズマ処理を行った.

プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の接着能を図 12 に示す. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面は, control と比較して細胞接着能は有意に高くなった (p<0.01). 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した PLLA 表面も control と比較して細胞接着能は高くなったが, 各種ガス中でプラズマ処理 した場合と比較して細胞接着能は有意に低くなった (p<0.01).

プラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の接着能を図 13 に示す. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面は, control と比較して細胞接 着能は有意に高くなった(p<0.01). 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面で

は,各種ガス中でプラズマ処理した場合と比較し細胞接着能はさらに有意に高くなった(p<0.01).

以上のことより、PLLA 表面での細胞接着能の制御を行うためには、 MC3T3-E1細胞の正常細胞を接着させたい部位にはAirプラズマ処理を行い、 HeLa 細胞のガン細胞を接着させたくない部位には、プラズマ処理を行わない 方が良いことがわかった.



図 11. ガス滅菌による PLLA 表面での接触角変化



図 12. プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の接着能



図 13. プラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の接着能

細胞培養1日および3日後のプラズマ処理したPLLA 表面でのMC3T3-E1 細胞の増殖能を図14と15に示す.Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>およびAr プラズマ処理した PLLA 表面は,細胞培養1日後で control と比較して細胞増殖能は有意に高く なった(p<0.01)(図14).一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理したPLLA 表面では,各種ガ ス中でプラズマ処理した試料と比較して,細胞増殖能は有意に低くなった (p<0.01).細胞培養3日後においては,細胞培養1日後の増殖能と比較して, ガスによる影響が明確に見られた(図15).Air および CO<sub>2</sub>プラズマ処理した PLLA 表面の場合には, control と比較して有意に増殖能が高くなった(p<0.01). N<sub>2</sub>およびAr プラズマ処理したPLLA 表面の場合には,Air および CO<sub>2</sub>プラズ マ処理した PLLA 表面よりも有意に細胞増殖能は高くなった(p<0.01).一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面では細胞増殖能は高くなった(p<0.01).一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面では細胞培養3日後でも control と比較して 有意差は認められなかった. 以上のことより、PLLA 表面での細胞増殖能の制御を行うためには、 MC3T3-E1 細胞の正常細胞を増殖させたい部位には N<sub>2</sub> プラズマ処理および Ar プラズマ処理を行い、HeLa 細胞のガン細胞を増殖させたくない部位には、 プラズマ処理を行わない方が良いことがわかった.



図 14. 細胞培養1日後のプラズマ処理した PLLA 表面での

MC3T3-E1 細胞の増殖能



図 15. 細胞培養3日後のプラズマ処理した PLLA 表面での

MC3T3-E1 細胞の増殖能

細胞培養1日および3日後のプラズマ処理したPLLA 表面でのHeLa 細胞 の増殖能を図16と17に示す. Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>およびAr プラズマ処理したPLLA 表面は,細胞培養1日後で controlと比較して細胞増殖能の有意な差は見られ なかった. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面では, control や他のガス中 でプラズマ処理した PLLA 表面と比較して有意な差が見られた (p<0.01) (図 16). しかし,細胞培養3日後の各種ガス中でプラズマ処理した PLLA 表面は, control と比較して影響は見られなかった (図 17).



図 16. 培養1日後のプラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の増殖能



図 17. 培養3日後のプラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の増殖能

Air プラズマ処理した PLLA 表面での3日間培養した MC3T3-E1 細胞を図 18に示す. Air プラズマ処理を行うことにより control と比較して細胞増殖能が高 くなり, PLLA 表面では MC3T3-E1 細胞が良好に伸展していることがわかる.



#### a) control



b) Air plasma

図 18. 細胞培養3日後のプラズマ処理した PLLA 表面での

MC3T3-E1 細胞の増殖能 (×200) a) control, b) Air plasma

## 3-4. 考察

本実験では、大気圧下低温プラズマ処理装置を用いて表面修飾した PLLA 表面の接触角、表面自由エネルギー、表面原子および官能基などを制御し、 PLLA 試料表面での MC3T3-E1 細胞や HeLa 細胞の細胞応答について検討し た.これまでにも、生体材料表面の濡れ性が細胞に及ぼす影響が報告されてき た<sup>45-50</sup>.基材の表面が適度に親水性になってくると、細胞は安定して粘着する. 水との接触角が約 60~70°の時、材料は最も多くのタンパク質が吸着するとと もに細胞もよく接着し、増殖することが知られている<sup>51)</sup>.即ち、極端に親水性で も疎水性でもない表面上に生体成分がよく付着し、それより親水性が高くなって も疎水性が高くなっても接着量は減少している.

本実験では、各種ガス中でプラズマ処理を行い、水との接触角の異なる PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞や HeLa 細胞の接着能について検討した.水 との接触角と MC3T3-E1 細胞と HeLa 細胞の接着能との関係を図 19 と図 20 に 示す. MC3T3-E1 細胞の接着能は、プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触 角が低下すると共に高くなった. HeLa 細胞の接着能は、プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触角との間に相関は見られなかった. 従って、水との接 触角と細胞接着能との関係は、細胞種により異なっていた.

これは単に水との接触角のみで細胞接着能を評価することは難しく, PLLA 表面の物理化学的表面(分子構造, 表面粗さ, 官能基の種類や量, 表面電荷

など)が大きく影響しているものと考えられる 26,27,52-57).



図 19. 接触角とMC3T3-E1 細胞の接着能との関係



図 20. 接触角とHeLa 細胞の接着能との関係

タンパク質に共通の細胞接着部位の最小単位がArg-Gly-Asp(RGD)の配列 を有するトリペプチドであることがわかり,材料表面にアミノ酸である Arg-Gly-Asp(RGD)を含むフィブロネクチン,コラーゲン,ラミニンおよびビトロ ネクチン等の接着性タンパク質をコートすると,細胞の接着や増殖が促進するこ とが報告されている<sup>58,59)</sup>. また, 材料表面を適度に親水化してタンパク質の吸着や細胞の粘着を制御することも報告されている<sup>60,61)</sup>.

表面自由エネルギーおよびその成分と細胞接着能との相関関係を表 7 に示 す. 表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)と MC3T3-E1 細胞 (マウス骨芽細胞様細胞)との間には強い順相関が見られた(p<0.01). 一方, HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)では, 表面自由エネルギー成分( $\gamma$ s<sup>P</sup>)と弱い 逆相関が見られた(p<0.01). このことより, 表面自由エネルギー( $\gamma$ s)およびそ の成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)が増加すると MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)の 接着能は高くなることがわかった. 一方, HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)は表 面自由エネルギー成分( $\gamma$ s<sup>P</sup>)が減少すれば細胞接着能が低くなることがわか った.

原子数比と細胞接着能との相関係数を表 8 に示す. MC3T3-E1 細胞(マウス 骨芽細胞様細胞)では, C1s 原子の増加とともに細胞接着能は低くなり, 強い逆 相関が見られた(p<0.01). 一方, O1s 原子や O1s/C1s 比の増加とともに MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)の細胞接着能は高くなり, 強い順相 関が見られた(p<0.01). このことから, PLLA 表面に MC3T3-E1 細胞(マウス骨 芽細胞様細胞)の接着能を高くさせるには C1s 原子を減少させ, O1s 原子を増 加させる必要があることがわかった. 一方, HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の 場合には, 細胞接着能と表面原子との間に相関性がみられなかった.

官能基と細胞接着能との相関係数を表9に示す. MC3T3-E1 細胞(マウス骨 芽細胞様細胞)は C=O 基が増加すると、細胞接着能は高くなり弱い順相関が 見られた(p<0.01). 一方、HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の場合には、C-H 結 合が減少すると細胞接着能が低くなり、強い逆相関が見られた(p<0.01).

以上のことから, MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)の接着能を高く するためには, PLLA 表面の C=O を含む官能基を増加させ, HeLa 細胞(ヒト子 宮頸ガン細胞)の接着能を低くするためには, C-H 結合を増加させれば良いこ とがわかった.

Surface free energy	Ce	lls
Surface free energy	MC3T3-E1	HeLa
γs	0.747**	0.069
γs <sup>đ</sup>	0.761**	-0.028
γs <sup>p</sup>	-0.213	-0.669**
γs <sup>h</sup>	0.786**	0.196
	*:p<0.05	**:p<0.01

表7. 表面自由エネルギー成分と細胞接着能との相関関係

表8. 原子数比と細胞接着能との相関係数

	Cel	lls
Atomic percentage	MC3T3-E1	HeLa
N1s	0.427*	0.446*
Cls	-0.781**	-0.320
Ols	0.725**	0.072
O1s/C1s	0.781**	0.320
	*	** -0.01

\*;p<0.05 \*\*;p<0.01

Even eti en el enere	Ce	lls
runcuonal group	MC3T3-E1	HeLa
COO	-0.197	0.464*
C=O	0.615**	0.227
C-O	-0.262	-0.384*
С-Н	-0.239	-0.713**
	*:n<0.05	** • n<0.01

表9. 官能基と細胞接着能との相関係数

表面自由エネルギー成分と細胞増殖能との相関係数を表 10 に示す. 表面 自由エネルギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)とMC3T3-E1 細胞(マウス骨 芽細胞様細胞)との間には培養1日後には弱い(p<0.05, 0.01)順相関が見られ, 培養3日後には弱い順相関(p<0.05)が見られた. HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細 胞)の場合には相関は見られなかった. これらのことから, MC3T3-E1 細胞(マウ ス骨芽細胞様細胞)を1日と3日間培養した PLLA 表面では, 表面自由エネル ギー( $\gamma$ s)およびその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)を増加すれば, 細胞増殖能が高くなるこ とがわかった. プラズマ処理することにより細胞接着能だけでなく, 細胞増殖能 にまで表面自由エネルギー成分が影響を受けることがわかった. 一方, HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の増殖能の場合には, 表面自由エネルギー成分の 影響は見られなかった.

原子数比と細胞増殖能との相関係数を表 11 に示す. C1s 原子と MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)との間には培養 1 日と 3 日後で弱い逆相関 (p<0.01)が見られた. 一方, O1s 原子や O1s/C1s 比と MC3T3-E1 細胞(マウス 骨芽細胞様細胞)との間には弱い順相関(p<0.01, 0.05)が見られた. これらの ことより, MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)では, PLLA 表面の C1s 原 子が減少すれば細胞増殖能は低くなり, O1s 原子や O1s/C1s 比が増加すれば 細胞増殖能が高くなることがわかった. 一方, HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞) の増殖能と原子数比との間に相関は見られなかった.

官能基と細胞増殖能との相関係数を表 12 に示す. MC3T3-E1 細胞(マウス 骨芽細胞様細胞)では, C=O 基の増加とともに細胞増殖能が高くなり, 弱い順 相関が見られた(p<0.01). 一方, HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)と官能基との 場合には相関が見られなかった. これらのことから, MC3T3-E1 細胞(マウス骨 芽細胞様細胞)は C=O を含む官能基を増加すれば細胞増殖能が高くなること がわかった. また, 表面原子や官能基は接着能だけではなく, 細胞増殖能にま で影響を及ぼすことが明らかとなった.

	Culture conditions				
Surface free energy	MC3T3-E1		HeLa		
	1 D	3 D	1 D	3 D	
$\gamma_{ m s}$	0.573**	0.435*	0.404	0.170	
$\gamma s^d$	0.553*	0.511*	0.271	0.194	
$\gamma s^p$	-0.039	-0.117	0.339	0.226	
γs <sup>h</sup>	0.587**	0.465*	0.337	0.121	
			*;p<0.05	**;p<0.01	

表10. 表面自由エネルギーおよびその成分と細胞増殖能との相関係数

表11. 原子数比と細胞増殖能との相関係数

	Culture conditions				
Atomic percentage	MC3T3-E1		H	HeLa	
	1 D	3 D	1 D	3 D	
N1s	0.181	-0.046	0.106	-0.168	
C1s	-0.587**	-0.560**	-0.240	-0.132	
Ols	0.575**	0.514*	0.385*	0.233	
O1s/C1s	0.587**	0.560**	0.240	0.132	
			*;p<0.05	**;p<0.01	

表12	官能基と細胞増殖能との相関核粉
1×12.	日 肥 巫 C 神 胞 培 7 但 肥 C 1/1 阳 舆 徐 叙

	Culture conditions				
Functional group	MC3	MC3T3-E1		HeLa	
	1 D	3 D	1 D	3 D	
COO	-0.237	-0.418	-0.132	-0.334	
C=O	0.569**	0.637**	0.175	0.137	
C-O	-0.296	-0.586	0.172	-0.083	
С-Н	-0.045	0.040	0.244	0.333	
			*;p<0.05	**;p<0.01	

細胞表面のタンパク質, 糖質, 脂質には, 高分子に対して反応性を持つ, ア ミノ基, カルボキシ基, 水酸基, チオール基, ジスルフィド基, vic-ジオール基, リ ン酸エステル, O-ヘミスルフェート, N-ヘミスルフェート, フェノールおよびイミダ ゾール置換基などの官能基が存在する<sup>62)</sup>. これらの官能基の多くはPLLA表面 と反応すると考えられている. カルボキシ基(COOH)や水酸基(OH)のようなポ リマー表面の特定の官能基<sup>63,64)</sup> あるいは表面の C-O 部位が細胞接着におい て大きく影響されることが報告されている<sup>65)</sup>.

近年の進展の著しい細胞生物学では、細胞表面の接着分子インテグリンが 関与するといわれる、細胞と細胞の接着機構、および細胞と基質の接着機構の 分子レベルでの理解が深まりつつある.生体は水、低分子イオン、糖質、アミノ 酸、脂質、多糖類、タンパク質、脂肪、細胞および組織などを体内に含んでいる. 生体組織が異物と接触すると、異物認識、免疫反応あるいは生体内取り込みと いった各種の生体反応が異物と生体組織との界面を中心として繰り広げられて いることから、材料と生体組織間の界面現象が重要な要素となってくる.細胞の 材料表面の粘着・活性化は通常材料表面に吸着したタンパク質を介して行わ れる.高分子が体液と接触した直後(1 秒以内)に、材料表面へのタンパク質吸 着が観察される.数秒以内に表面は単分子層で覆われ、吸着タンパク質の交 換や重層化が起こる.

本実験では、Air、CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面での細胞 接着能や細胞増殖能は、MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)では濡れ 性、表面自由エネルギー( $\gamma$ s)とその成分( $\gamma$ s<sup>d</sup>,  $\gamma$ s<sup>h</sup>)、O1s 原子、O1s/C1s 比 および C=O 基に影響を受けて増加することが明らかになった.このことは、細胞 接着能や増殖能は、たんに濡れ性だけでなく表面の官能基によっても影響され ることを示唆している.その結果、プラズマ処理した PLLA 表面は、タンパク質の 吸着量が増加し、細胞接着能や細胞増殖能が高くなったものと考えられる.

#### 3-5. 結 論

本研究では、大気中(Air)および雰囲気ガス(CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>)中でプラズ マ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)や HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の細胞接着能、細胞増殖能および形態観察につい て検討し、濡れ性、表面自由エネルギー、表面原子および官能基の種類や量 と細胞応答との関係について検討した結果、以下の結論を得た.

#### 1. ガス滅菌がプラズマ処理した PLLA 表面の濡れ性に及ぼす影響

ガス滅菌した control(未処理)の PLLA 表面の接触角は 12 時間後に増加 したが, 24 時間後には回復した. また, Air プラズマ処理した PLLA 表面の接 触角は, ガス滅菌により増加した.

# ガス雰囲気中でプラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞 (マウス骨芽細胞様細胞)の接着能

Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の 接着能は control と比較して高くなった. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表 面の細胞接着能は, Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理と比較して低くなった. また, MC3T3-E1 細胞と表面自由エネルギー( $\gamma_s$ )およびその成分( $\gamma_s^d$ ,  $\gamma_s^h$ ), O1s および O1s/C1s 比との間には強い順相関が見られ, C=O との間には弱い 順相関が認められた.一方, MC3T3-E1 細胞とC1sとの間には強い逆相関が認められた.

#### 3. ガス雰囲気中でプラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞

(ヒト子宮頸ガン細胞)の接着能

Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の接着能は control と比較して高くなった. さらに, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面の細胞接着能は, Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面と比較して高くなった. HeLa 細胞と PLLA 表面の C-H 結合との間には強い逆相関が見られ, 表面自由エネルギー( $\gamma_s^p$ )との間には弱い逆相関が認められた.

# ガス雰囲気中でプラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞 (マウス骨芽細胞様細胞)の増殖能

Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞 の増殖能(1,3日間)は control と比較して高くなった. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処 理した PLLA 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. また, MC3T3-E1 細胞と表面自由エネルギー( $\gamma_s$ )およびその成分 ( $\gamma_s^d$ ,  $\gamma_s^h$ ), O1s, O1s/C1s 比および C=O 基との間には弱い順相関が認めら れた. 一方, MC3T3-E1 細胞とC1s 原子との間には弱い逆相関が認められた. Airプラズマ処理した PLLA 表面での細胞増殖能は, 蛍光顕微鏡で撮影した 写真からも control と比較して良好に伸展していることが認められた.

#### 5. ガス雰囲気中でプラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞

#### (ヒト子宮頸ガン細胞)の増殖能

Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 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<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した PLLA 表面の細胞増殖能は Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面と比較して低くなった. 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. また, HeLa 細胞の増殖能では相関性は認めら れなかった.

#### 4. 結 言

本実験では,大気圧下で簡便に表面処理が可能な低温プラズマ処理装置を 用いて,細胞接着性の制御を目的とし MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細 胞)および HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の細胞応答を検討した.第1部では, 大気圧中(Air)および CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, Ar, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>のガス雰囲気中でプラズマ処理した PLLA の表面性状観察,表面粗さ,水との接触角,表面自由エネルギー,表面 元素および表面の官能基について検討した.第2部では,プラズマ処理前後の PLLA 試料表面での MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)および HeLa 細 胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の細胞接着能や細胞増殖能などの細胞応答について 検討した結果,以下の結言を得た.

- Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の濡れ性は向上したが, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>プラズマ処理した PLLA 表面の濡れ性は低下した.このことから, プラズマ処理する雰囲気ガスを変えることにより濡れ性を制御できることが示唆された.
- Air, CO<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の濡れ性向上は, Ols 原子および Ols/Cls 比などの増加により親水性表面に改質できたこ とによるものであった. 一方, C<sub>3</sub>F<sub>8</sub> プラズマ処理した PLLA 表面はフッ化 物(CF, CF<sub>2</sub> および CF<sub>2</sub>O)の増加により疎水性表面に改質できたことによ

るものであった.

- PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)の接着能は, 濡れ性, O1s および O1s/C1s 比が増加するに従って, 高くなることがわか った. HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の接着能は, PLLA 表面の C-H 結 合と表面自由エネルギー成分(y<sup>P</sup>)が増加するに従って低くなることがわ かった.
- 4. PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞(マウス骨芽細胞様細胞)の増殖能は, Ols および Ols/Cls 比が増加するに従って高くなることがわかった. HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)の増殖能ではこれらとの相関性は認められな かった.

以上のことより,大気圧下低温プラズマ処理装置を用いた PLLA の scaffold 表面における細胞接着能の制御を行うための表面改質は, MC3T3-E1 細胞(マ ウス骨芽細胞様細胞)を接着させたい部位には Air プラズマ処理を行い, HeLa 細胞(ヒト子宮頸ガン細胞)を接着させたくない部位には,プラズマ処理を行わ ない方が良いことがわかった.このことから,大気圧下低温プラズマ処理装置を 用いた PLLA の表面改質は,プラズマ処理する雰囲気ガスを変えることにより, 簡便に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.

#### 5. 謝辞

稿を終えるにあたり,本研究を行う機会を与えて頂き,御指導と御校閲を賜り ました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座 高橋純造教授に 謹んで感謝の意を表します.また本研究の遂行に際し,終始変わらぬ御指導を 賜りました大阪大学大学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座 寺岡文雄講 師に深く感謝いたします.さらに,本研究に対して御理解,御協力を頂きました 大阪大学大学院工学研究科マテリアル応用工学 藤本慎司教授,大阪大学大 学院歯学研究科顎口腔機能再建学講座(歯科理工学教室)の諸先生ならびに 滋慶学園宮川藤一郎副理事長,新大阪歯科技工士専門学校,東洋医療専門 学校の教職員の方々に心からお礼申し上げます.

本論文の要旨は,第37回日本歯科理工学会(2001年3月31日,東京),日 本歯科理工学会 近畿中四国支部 夏期セミナー(2001年8月24日,岡山), 第38回日本歯科理工学会(2001年10月6日,福岡),第39回日本歯科理工 学会(2002年4月12日,東京),第41回日本歯科理工学会(2003年4月12 日,東京)および日本歯科理工学会,近畿・中国夏期セミナー(2003年8月23 日,京都)において発表した.

## 6. 文 献

- 1) 筏 義人(2001):再生医工学. 第1版, 化学同人, 東京, 41-58.
- Lu L, Peter SJ, Lyman MD, Lai HL, Leite SM, Tamada JA, Vacanti JP, Langer R, Mikos AG. In vitro degradation of porous poly (L-lactic acid) foams. Biomaterials 2000; 21: 1595-1605.
- Tsuji H, Del Carpio CA. In vitro hydrolysis of blends from enantiomeric poly (lactide)s.3. Homocrystallized and amorphous blend films.

Biomacromolecules 2003; 4: 7-11.

- 4) Makela P, Pohjonen T, Tormala P, Waris T, Ashammakhi N. Strength retention properties of self-reinforced poly L-lactide (SR-PLLA) sutures compared with polyglyconate (Maxon) and polydioxanone (PDS) sutures. An in vitro study.: Biomaterials 2002; 23: 2587-2592.
- 5) Hattori K, Tomita N, Tamai S, Ikada Y. Bioabsorbable thread for tight tying of bones. J Orthop Sci. 2000; 5: 57-63.
- 6) Suuronen R, Manninen MJ, Pohjonen T, Laitinen O, Lindqvist C. Mandibular osteotomy fixed with biodegradable plates and screws: an animal study. Br J Oral Maxillofac Surg 1997; 35: 341-348.
- 7) Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G. Late degradation tissue response to poly (L-lactide) bone plates and screws.

Biomaterials 1995; 16: 25-31.

- 8) Nordstrom P, Pohjonen T, Tormala P, Rokkanen P. Shear-load carrying capacity of cancellous bone after implantation of self-reinforced polyglycolic acid and poly-L-lactic acid pins: experimental study on rats. Biomaterials 2001; 22: 2557-2561.
- 9) Nordstrom P, Pihlajamaki H, Toivonen T, Tormala P, Rokkanen P. Tissue response to polyglycolide and polylactide pins in cancellous bone. Arch Orthop Trauma Surg 1998; 117: 197-204.
- 10)Bromberg LE, Buxton DK, Friden PM. Novel periodontal drug delivery system for treatment of periodontitis. J Control Release 2001; 28; 71: 251-259.
- 11) Hyon SH. Biodegradable poly (lactic acid) microspheres for drug delivery systems. Yonsei Med J 2000; 41: 720-734.
- 12)谷原正夫(2002):有機・無機ハイブリッドと組織再生材料. 初版, アイピーシー, 9-14.
- 13)日本化学会(1984):表面の改質.第4版,学会出版センター, 7-52.

14)黒崎和夫,三木哲郎(2001):実用高分子表面分析. 第1版, 講談社, 71-78.
15)長田義仁(1998):低温プラズマ材料化学, 第7章プラズマ表面処理(長田 義仁編). 第1版, 産業図書, 東京, 191-232.

16)Shan-hui H, Wei-Chih C. Improved cell adhesion by plasma-induced grafting

of L-lactide onto polyurethane surface. Biomaterials 2000; 21; 359-367.

- 17)Gilson K, Ju-Hyoung J, Jin-Whan L, Soon-Chae C, Hai-Bang L. Cell and platelet adhesions on plasma glow discharge-treated poly (lactide-co-glycolide). Bio-Med Mater Eng 1997; 7: 357-368.
- 18)Fernandes CP, Vassilakos N. Accuracy, detail reproduction, and hardness of gypsum casts produced from silicone impressions treated with glow discharge. J. Prosthet Dent 1993; 70: 457-464.
- 19)Ozden N, Akaltan F, Suzer S, Akovali G. Time-related wettability characteristic of acrylic resin surfaces treated by glow discharge. J Prosthet Dent 1999; 82:680-684.
- 20)Carlsson LV, Alberktsson T, Berman C. Bone response to plasma-cleaned titanium implants. Int J Oral Maxillofac Implants 1989; 4: 199-204.
- 21)宮山直也,吉成正雄,小田豊(1999):ドライプロセスによるインプラント用 チタンの表面改質 表面の特性評価.歯材器 18:109-121.
- 22)Aronsson BO, Hjorvarsson B, Frauchiger F, Taborelli M, Vallotton PH, Descounts P. Hydrogen desorption from sand-blasted and acid-etched titanium surfaces after glow-discharge treatment. J Biomed Mater Res 2001; 54: 20-29.
- 23)Baier RE, Carter JM, Sorensen SE, Meyer AE, McGowen BD, Kasprzak SA.Radiofrequency gas plasma (glow discharge) disinfection of dental operative

instruments, including handpieces. J Oral Implantol 1992; 18: 236-242.

24)北崎寧昭,畑 敏雄(1972):Fowkes 式の拡張と高分子固体の表面張力の 評価.日本接着協会誌, 8: 131-141.

25)長田 理 他(1999): Statview 5.0 完全マスターガイド. 南江堂, 123-133.

- 26)Rosa AL, Beloti MM.Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness. Clin Oral Implants Res 2003; 14: 43-48.
- 27)Lange R, Luthen F, Beck U, Rychly J, Baumann A, Nebe B.Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material. Biomol Eng 2002; 19:255-261
- 28)Rohner D, Hutmacher DW, See P, Tan KC, Yeow V, Tan SY, Lee ST, Hammer B. Individually CAD-CAM technique designed, bioresorbable 3-dimensional polycaprolactone framework for experimental reconstruction of craniofacial defects in the pig. Mund Kiefer Gesichtschir 2002; 6: 162-167.
- 29)Ushida T, Furukawa K, Toita K, Tateishi T. Three-dimensional seeding of chondrocytes encapsulated in collagen gel into PLLA scaffolds. Cell Transplant 2002; 11: 489-494.
- 30)Furukawa KS, Ushida T, Toita K, Sakai Y, Tateishi T. Hybrid of gel-cultured smooth muscle cells with PLLA sponge as a scaffold towards blood vessel regeneration. Cell Transplant 2002; 11: 475-480.

- 31)Watanabe J, Eriguchi T, Ishihara K. Cell adhesion and morphology in porous scaffold based on enantiomeric poly (lactic acid) graft-type phospholipid polymers. Biomacromolecules 2002; 3: 1375-1383.
- 32)Hua FJ, Kim GE, Lee JD, Son YK, Lee DS. Macroporous poly (L-lactide) scaffold 1. Preparation of a macroporous scaffold by liquid-liquid phase separation of a PLLA- dioxane-water system. J Biomed Mater Res 2002; 63: 161-167.
- 33)Evans GR, Brandt K, Niederbichler AD, Chauvin P, Herrman S, Bogle M, Otta L, Wang B, Patrick CW Jr. Clinical long-term in vivo evaluation of poly (L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. J Biomater Sci Polym Ed 2000; 11: 869-78.
- 34)木林博之. プラズマ処理による歯科用金属の表面修飾とレジンとの接着. 大阪大学大学院歯学研究科学位論文 2003.
- 35)Gye-Hwa S, Yeon-Hee L, Jin-sil L, Young-Soo K, Won-Seok C and Hyun-JinP. Preparation of plastic and biopolymer multiplayer films by plasma source ion implantation. J Agric Food Chem 2002; 50: 4608-4614.
- 36)Grunkemeier JM, Tsai WB, Alexander MR, Castner DG, Horbett TA. Platelet adhesion and procoagulant activity induced by contact with radiofrequency glow discharge polymers. Roles of adsorbed fibrinogen and vWF. J Biomed MaterRes 2000; 51: 669-679.

- 37)Iriyama Y, Yasuda H. Fundamental aspect and behavior of saturated fluorocarbons in glow discharge in absence of potential source of hydrogen. J Polym Sci 1992; 30: 1731-1739.
- 38)Haque Y, Ratner BD. Role of negative ions in the RF plasma deposition of fluoropolymer films from perfluoropropane. J Polym Sci Polym Phys 1988; 26:1237-1249.
- 39)中林宣男,石原一彦,岩崎泰彦(1999):バイオマテリアル.初版,コロナ社, 東京,35.
- 40) 筏義人 (1998): 表面の科学. 第4版, 産業図書, 東京, 116-132.
- 41) 長倉三郎他(1998): 理化学辞典. 第5版, 岩波書店, 東京, 609, 693, 763.
- 42)H.Otsuka, Y.Nagasaki, K.Kataoka. Dynamic wettability study on the functionalized PEGylated layer on a polylactide surface constructed by the coating of aldehyde-ended poly (ethylene glycole) (PEG) / polylactide (PLA) block copolymer. Sci Techn Advan Mater 2000; 1: 21-29.
- 43) 近藤精一他(1999): 吸着の科学. 第6版, 丸善, 東京, 137-141.
- 44)角田光雄(1984):表面の改質.第1版,学会出版センター,東京, 99-108.
- 45)Izumi Y, Sakuma H, Shimura M, Wakamatsu Y, Yanagisawa S, Sairenji E. The effects of "Wettability" of biomaterials on culture cells. J Oral Implantol 1989; 15: 168-177

- 46) Jin-Ho L, Gilson K, Jin-Whan L, Hai-Bang L. Interaction of different types of cells on polymer surfaces with wettability gradient. J Colloid Interf Sci1998; 205: 323-330.
- 47)Antonios G. Mikos M, Lyman D, Freed LE, Langer R.Wetting of poly (L-lactide acid) and poly (DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture. Biomaterials 1994,15: 55-58
- 48) Jin-Ho L, Sang-Jin L, Gilson K, Hai-Bang L. The effect of fluid shear stress on endothelial cell adhesiveness to polymer surfaces with wettability gradient. J Colloid Interf Sci 2000; 230:84-90.
- 49)Lampin M, Warocquier-Clerout R, Legris C, Degrange M, Sigot-Luizard MF. Correlation between substratum roughness and wettability, cell adhesion and cell migration. J Biomed Mater Res 1997; 36: 99-108.
- 50)Lam KH, Schakenraad JM, Groen H, Esselbrugge H, Dijkstra PJ, Feijin J, Nieuwenhuis P. The influence of surface morphology and wettability on the inflammatory response against poly (L-lactic acid): A semi-quantitative study with monoclonal antibodies. J Biomed Mater Res 1995; 29: 929-942.
- 51) 中林宣男, 石原一彦, 岩崎泰彦(1999): バイオマテリアル. 初版, コロナ社, 東京, 150-152.
- 52)Park A, Cima LG. In vitro cell response to differences in poly-L-lactide crystallinity. J Biomed Mater Res 1996; 31: 117-30.

- 53)Brodbeck WG, Shive MS, Colton E, Nakayama Y, Matsuda T, Anderson JM.Influence of biomaterials surface chemistry on the apoptosis of adherent cells.J Biomed Mater Res 2001; 55, 661-668.
- 54)Bruil A, Terlingen JGA, Beugeling T, van Aken WG, Feijen J. In vitro leucocyte adhesion to modified polyurethane surface. I Effect of ionizable functional groups. Biomaterials 1992; 13: 915-923.
- 55) Jin -Ho L, Gilson K, Jin-Whan L, Ha-Bang L. Platelet adhesion onto chargeable functional group gradient surfaces. J Biomed Mater Res 1998; 40: 180-186.
- 56) Jin-Ho L, Hee-Won J, In-Kyu K, Hai-Bang L. Cell Behaviour on polymer surfaces with different functional groups. Biomaterials 199; 15: 705-711.
- 57) Jin-Ho L, Jin-Whan L, Gilson K, Hai-Bang L.: Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. Biomaterials 1997; 18: 351-358.
- 58)Cui YL, Hou X, Qi AD, Wang XH, Wang H, Cai KY, Ji Yin Y, De YK. Biomimetic surface modification of poly (L-lactic acid) with gelatin and its effects on articular chondrocytes in vitro. J Biomed Mater Res 2003; 66A: 770-778.
- 59)Ma Z, Gao C, Gong Y, Ji J, Shen J. Immobilization of natural macromolecules on poly-L-lactic acid membrane surface in order to improve

its cytocompatibility. J Biomed Mater Res 2002; 63: 838- 847.

- 60)Hsu SH, Tsai CL, Tang CM. Evaluation of cellular affinity and compatibility to biodegradable polyesters and Type-II collagen-modified scaffolds using immortalized rat chondrocytes. Artif Organs 2002; 26: 647-658.
- 61)Koenig AL, Gambillara V, Grainger DW. Correlating fibronectin adsorption with endothelial cell adhesion and signaling on polymer substrates. J Biomed Mater Res 2003; 64A: 20-37.
- 62)今西幸男, 桜井靖久, 妹尾 学, 竹本喜一(1982):医用材料と生体. 第1版, 講談社, 東京, 74-105.
- 63)Curtis A., Forrester, J.et al. Adhesion of cells to polystyrene surfaces. J Cell Biol 1983; 97: 1500-1506.
- 64)Lydon M, Minett T.et al. Cellular interactions with synthetic polymer surfaces in culture. Biomaterials 1985; 6:396-402.
- 65) Chinn J, Horbett T.et al. Enhancement of serum fibronectin adsorption and the clonal plating efficiencies of Swiss mouse 3T3 fibroblast and MM14 mouse myoblast cells on polymer substrates modified by radiofrequency plasma deposition. J Colloid Interf Sci.1989; 127: 67-87.

