

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	P 9
• 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 表面のナロースキンスペクトル	P 14
• ナロースキ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
• ナロースキンスペクトルから求めた PLLA 表面の C1s 原子の結合状態	P 16
2-4. 考察	P 17-25
• Air, CO ₂ , N ₂ 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	P 21
• 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
• 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	P 30
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
・ プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の接着能	P 33
・ プラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の接着能	P 34
・ 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	P 36
・ 細胞培養 3 日後の Air プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の蛍光顕微鏡写真	P 37
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	P 39
・ 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	P 41
・ 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	P 44
・ 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	P 50-51
5. 謝辞	P 52
6. 文献	P 53-61

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¹⁾。

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^{2,3)}。そのため、外科用縫合糸^{4,5)}、骨プレート^{6,7)}、骨固定ピン^{8,9)}、DDS(ドラッグデリバリーシステム)用マトリックス^{10,11)}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¹²⁾。

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¹³⁾。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¹³⁾。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¹³⁾。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¹⁴⁾。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¹⁵⁾。

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^{16,17)}。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、H₂、O₂、N₂、NH₃およびCF₄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¹⁸⁾、アクリルレジンの濡れ性の向上¹⁹⁾、インプラントの表面改質²⁰⁻²²⁾および歯科用器具の殺菌²³⁾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 CO₂, N₂, Ar, C₃F₈ 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(ラクティール5000, PSPM1801, 島津製作所, 日本)を 215°C のステンレスシリンダー内で 35 分間加熱溶解し, 4°C に冷却した金型に射出成形機(スルフォジェット 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°C 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_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. 以下, Air プラズマ, CO_2 プラズマ, N_2 プラズマ, Ar プラズマ, C_3F_8 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

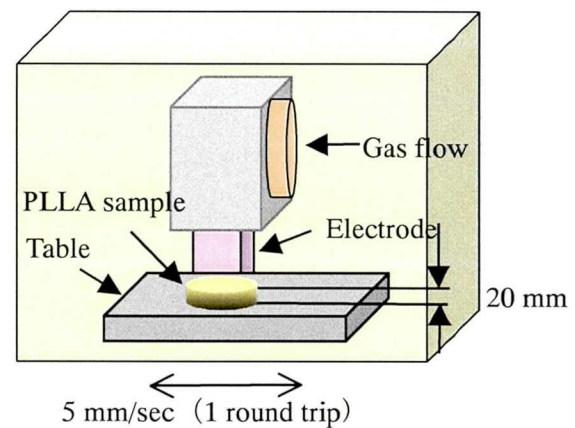


図2. プラズマ処理装置の構成図と
プラズマ処理条件

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($\times 100$)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、 $0.3 \mu\text{l}$ 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(γ_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)²⁴⁾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(γ_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。まず、各液を試料上に $0.3 \mu\text{l}$ 滴下して、10秒後に接触角(θ_{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(W_{SL})を求めた。

$$W_{SL} = \gamma_L (1 + \cos \theta_{SL}) ; \text{Young-Dupre の式} \text{ -- ①}$$

また, W_{SL} 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.

$$W_{SL} = 2(\gamma_s^d \cdot \gamma_L^d)^{1/2} + 2(\gamma_s^p \cdot \gamma_L^p)^{1/2} + 2(\gamma_s^h \cdot \gamma_L^h)^{1/2} \text{ -- ②}$$

$\gamma_L^d, \gamma_L^p, \gamma_L^h$ 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 (θ_{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 (γ_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.

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p + \gamma_s^h ; \text{拡張 Fowkes の式} \text{ -- ③}$$

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.

表1. 使用した3成分の表面自由エネルギー ²⁴⁾

Liquids	Surface free energy (mJ/m ²)			
	γ_s	γ_s^d	γ_s^p	γ_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

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 $Mg K \alpha$ を供給源とし, ワイドスキンスペクトルは電流 5mA, 電圧 10KV, ナロースキ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²⁵⁾.

2-3. 結果

プラズマ未処理の PLLA 表面(control)と Air プラズマ処理を 1 および 2 往復した PLLA 表面の表面性状と表面粗さ(Ra)を図 3 に示す. control と Air プラズマ処理を 1 往復した PLLA 表面の表面粗さは $0.03 \mu\text{m} (\pm 0.01)$ と $0.05 \mu\text{m} (\pm 0.02)$ であったが, 2 往復の場合は $0.14 \mu\text{m} (\pm 0.06)$ と有意に増加した. 試料の表面粗さが細胞応答に影響を与える報告があるため^{26,27)}, 以下の実験では表面粗さにおいて control と有意差が見られなかった 1 往復のプラズマ処理を行った.

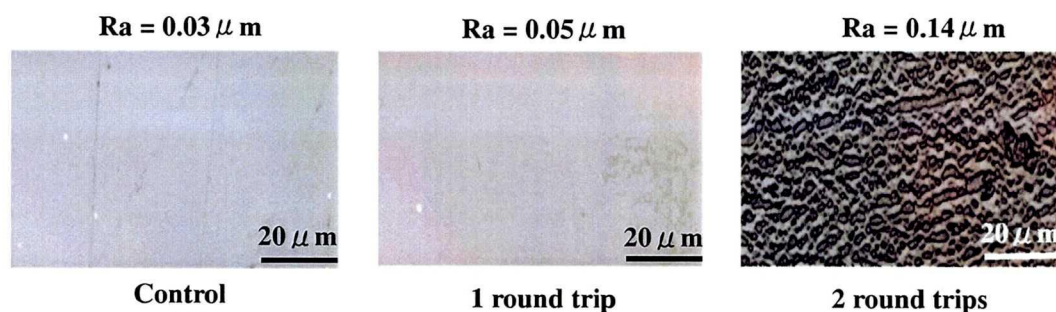


図 3. プラズマ照射往復回数と PLLA 表面の表面性状との関係 (×100)

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, CO₂, N₂ 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 ($p < 0.01$). N₂ や Ar プラズマ処理した PLLA 表面の接触角は Air や CO₂

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_3F_8 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 ($p < 0.01$).

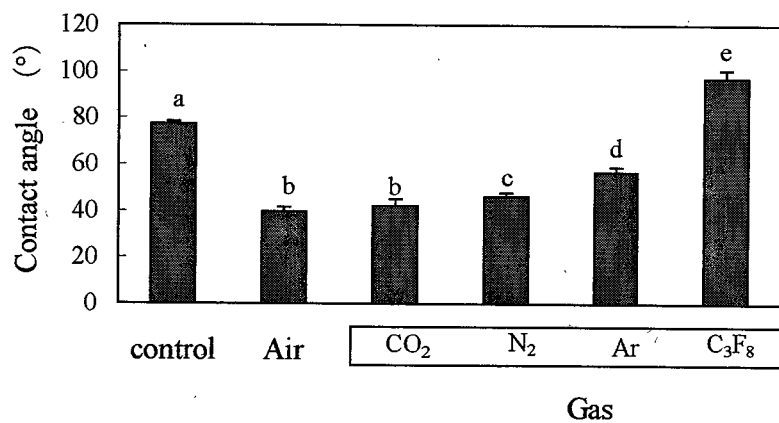


図 4. プラズマ処理前後の PLLA 表面の水との接触角

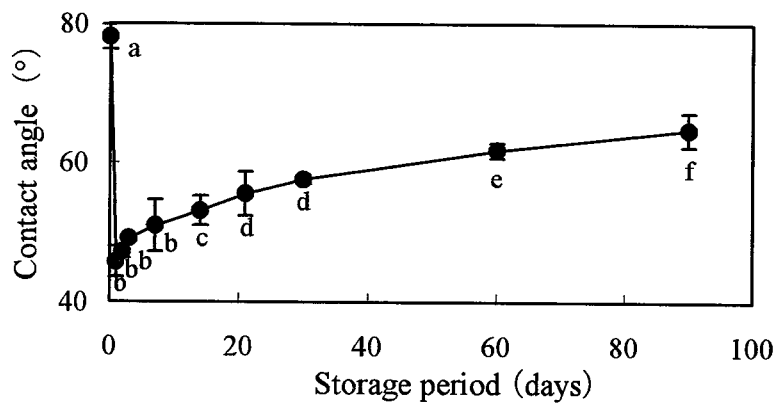


図 5. Air プラズマ処理した PLLA 表面の水との接触角の経時変化

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, CO₂, N₂ 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 (γ_s) の分散成分 (γ_s^d) と双極子成分 (γ_s^p) 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 (γ_s^h) は control と比較して著しく増加した。一方、C₃F₈ プラズマ処理した PLLA 表面の表面自由エネルギー (γ_s) とその成分 (γ_s^d , γ_s^p および γ_s^h) は control と比較して減少した。

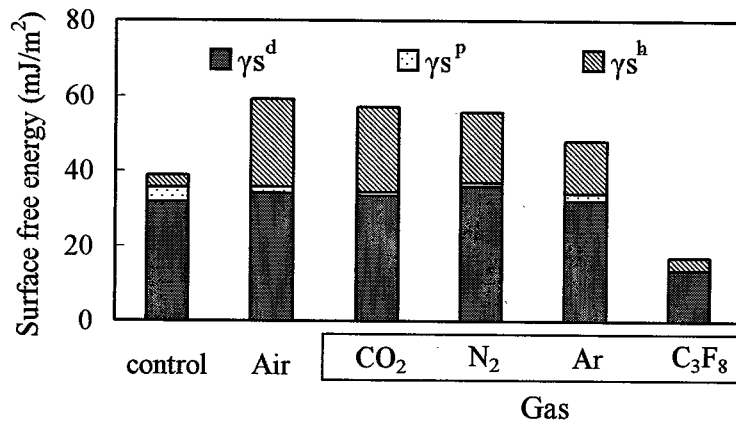


図 6. プラズマ処理前後の PLLA 表面の表面自由エネルギー

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, CO₂, N₂, 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、C₃F₈ 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 表面のナローズキャンスペクトルを図 8 に示す。control および Air, CO₂, N₂, 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。C₃F₈ 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), CF₂ (290.8eV) および CF₂O (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。

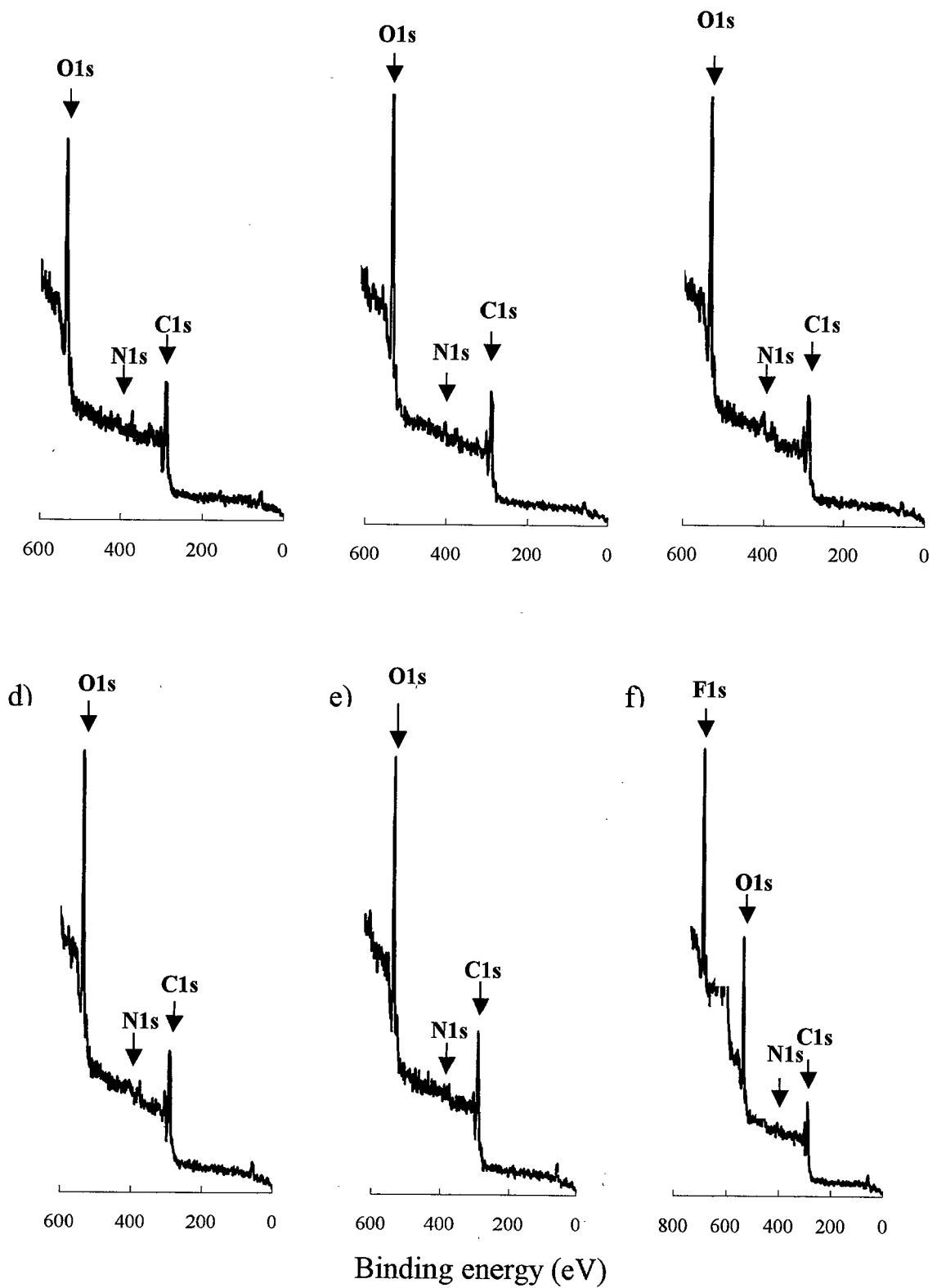


図 7. プラズマ処理前後の PLLA 試料表面の XPS ワイドスキンスペクトル

a) control, b) Air plasma, c) CO₂ plasma, d) N₂ plasma, e) Ar plasma, f) C₃F₈ plasma

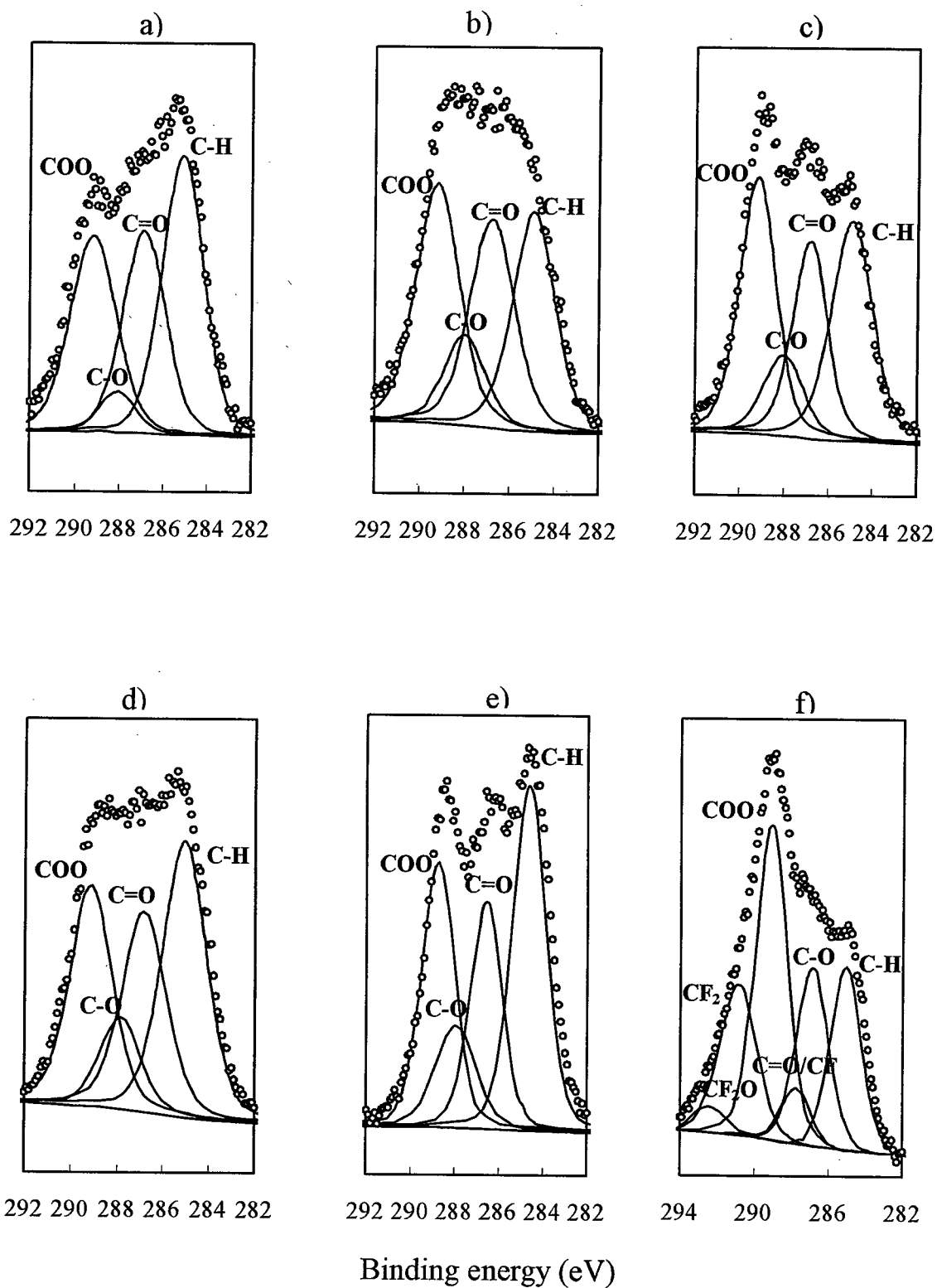


図 8. XPS 分析のナローキャンスペクトル

a) control, b) Air plasma, c) CO₂ plasma, d) N₂ plasma, e) Ar plasma, f) C₃F₈ 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, CO₂, N₂ および C₃F₈ 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, CO₂, N₂ および Ar プラズマ処理した PLLA 表面では増加したが, C₃F₈ 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, CO₂, N₂, Ar および C₃F₈ 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 C₃F₈ 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 C₃F₈ プラズマ処理以外の全てのガスで増加し, CO₂ プラズマ処理した PLLA 表面が最も大きくなった. 一方, C₃F₈ 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, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ 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), CF₂ (290.8eV) および CF₂O (292.3eV) などのフッ化物の存在が確認された.

表2. ナロースキ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

Gas	Atomic percentage (%)				
	N1s	O1s	C1s	F1s	O1s/C1s
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 ₃ F ₈	1.90	27.39	32.25	38.46	0.85

表3. ナロースキンスペクトルから求めたPLLA表面のC1原子の結合状態

Gas	Functional group (%)						
	COO	C=O	C-O	C-H	CF	CF ₂ O	CF ₂
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 ₃ F ₈	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成型およびレーザー加工などがある²⁸⁻³³⁾。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¹⁸⁾。このラジカルは雰囲気中存在するガス(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中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³⁴⁾。

プラズマガスの種類は CO_2 、 N_2 および C_3F_8 などのような活性ガスや Ar などの不活性ガスがある。 C_3F_8 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 C_3F_8 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³⁷⁾。重合性と非重合性の境界付近に存在する C_3F_8 (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³⁸⁾。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($10^4 \sim 10^5 \text{K}$)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¹⁴⁾。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³⁹⁾。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⁴⁰⁾。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氣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⁴¹⁾。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²⁴⁾。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⁴²⁾。

Air, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ 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⁴³⁾。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ー(γ_s)は, Air, CO₂, N₂ 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 (γ_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_2 , N_2 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 (γ_s) とは逆の結果が得られた (図 6)。

Air, CO_2 , N_2 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 (γ_s^d) および水素結合成分 (γ_s^h) と接触角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 (γ_s) の増加は、主に分散成分 (γ_s^d) と水素結合成分 (γ_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
γ_s^d	-0.818**
γ_s^p	-0.021
γ_s^h	-0.966**

*; $p < 0.05$ **; $p < 0.01$

XPS 分析では、Air, CO_2 , N_2 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_2 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 原子を含む雰囲気中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_3F_8 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

原子を含む雰囲気中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, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ プラズマ処理した PLLA 表面では CF, CF₂ および CF₂O 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(γ_s)およびその成分(γ_s^d , γ_s^h)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(γ_s)およびその成分(γ_s^d , γ_s^h)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(γ_s)およびその成分(γ_s^d , γ_s^h)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(γ_s)およびその成分(γ_s^d , γ_s^h)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(γ_s)およびその成分(γ_s^h)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(γ_s^p)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(γ_s)およびその成分(γ_s^h)が増加すると C=O の官能基が増加し, γ_s^p 成分が増加すると C-H 結合が増加することがわかった。

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O1s/C1s比との相関係数

Surface free energy	Atomic percentage (%)			
	N1s	O1s	C1s	O1s/C1s
γ_s	0.600 [*]	0.943 ^{**}	-0.886 ^{**}	0.886 ^{**}
γ_s^d	0.314	0.771 ^{**}	-0.714 ^{**}	0.714 ^{**}
γ_s^p	-0.543 [*]	-0.086	0.371 [*]	-0.371 [*]
γ_s^h	0.667 ^{**}	0.928 ^{**}	-0.927 ^{**}	0.928 ^{**}

*;p<0.05 **;p<0.01

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

Surface free energy	Functional group (%)			
	COO	C=O	C-O	C-H
γ_s	-0.086	0.600 ^{**}	0.029	-0.143
γ_s^d	-0.486 [*]	0.429	0.086	-0.029
γ_s^p	-0.486 [*]	0.086	0.371 [*]	0.829 ^{**}
γ_s^h	0.000	0.638 ^{**}	-0.058	-0.290

*;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⁴⁴⁾。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¹⁵⁾。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れ、このラジカルが CO₂ や N₂ 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。C₃F₈ プラズマ処理した PLLA 表面は、CF、CF₂ および CF₂O 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、CO₂、N₂ 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 (γ_s) および水素結合成分 (γ_s^h) が増加し、接触角が減少したものと考えられる (図 9)。また、C₃F₈ 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(γ_s)および水素結合成分(γ_s^h)が減少し、接触角が増加した
ものと考えられる(図10).

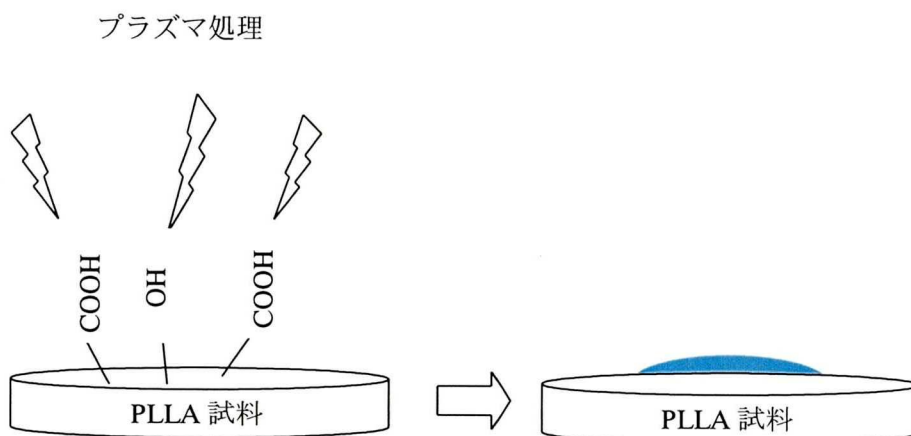


図9. Air, CO₂, N₂ および Ar プラズマ処理による
PLLA 表面の官能基形成の模式図

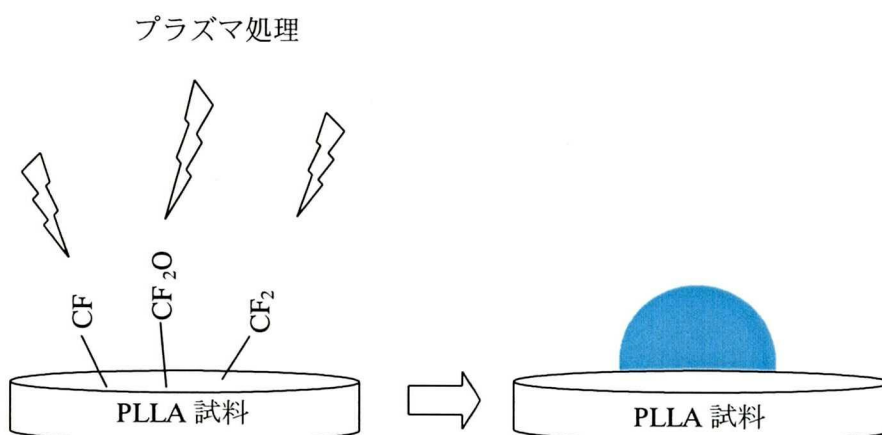


図10. C₃F₈ プラズマ処理による PLLA 表面の官能基形成の模式図

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. Air, CO₂, N₂ および Ar プラズマ処理

Air, CO₂, N₂ 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 (γ_s) とその成分 (γ_s^d , γ_s^h) の増加が認められ濡れ性が向上した。

3. C₃F₈ プラズマ処理

C₃F₈ 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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^d , γ_s^h) が減少し、2) 疎水基 (CF, CF₂O) 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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^h , γ_s^d) 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(γ_s)およびその成分(γ_s^d , γ_s^h)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(γ_s)およびその成分(γ_s^d , γ_s^h)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_2 , N_2 , Ar, C_3F_8) 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 $\phi 15.6 \times 2\text{mm}$ 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°C 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 (SEMMELE 601-MDX, ジェーエムシー医器研, 日本) を用いて 55°C で 8 時間の条件で行った. 滅菌後の試料は, 23°C のデシケ

一夕内にて保存した。

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°C 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. 細胞接着能試験

細胞接着能試験は control, Air プラズマ, CO₂ プラズマ, N₂ プラズマ, Ar プラズマ および C₃F₈ 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、 5×10^5 個/ml に調整した MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞を播種し、37°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 μ l) 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) (20 μ l) で細胞を溶解後、室温で 10 分間放置し、蒸留水を 80 μ l 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, CO₂ プラズマ, N₂ プラズマ, Ar プラズマおよび C₃F₈ 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 \times 10⁴ 個/ml に調整した MC3T3-E1 細胞および HeLa 細胞を播種し, 37°C 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 μ l 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²⁵⁾。

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わない場合の PLLA 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, CO₂, N₂ 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、C₃F₈ 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, CO₂, N₂ 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、C₃F₈ 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。

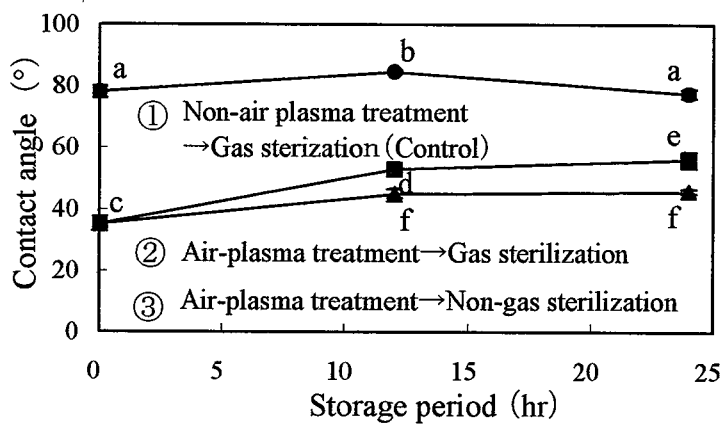


図 11. ガス滅菌による PLLA 表面での接触角変化

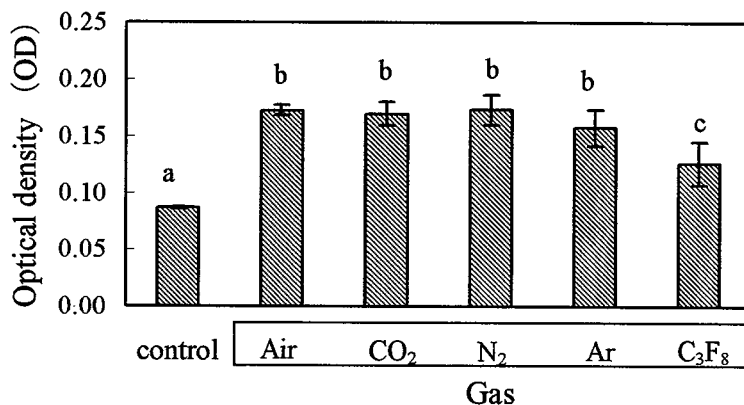


図 12. プラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の接着能

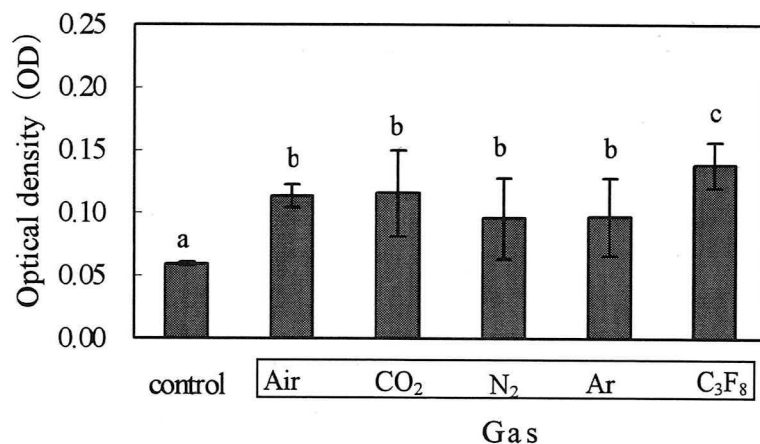


図 13. プラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の接着能

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, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ 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 CO₂ 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 ($p < 0.01$). N₂ および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の場合には, Air および CO₂ 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, C₃F₈ 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 N₂ 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。

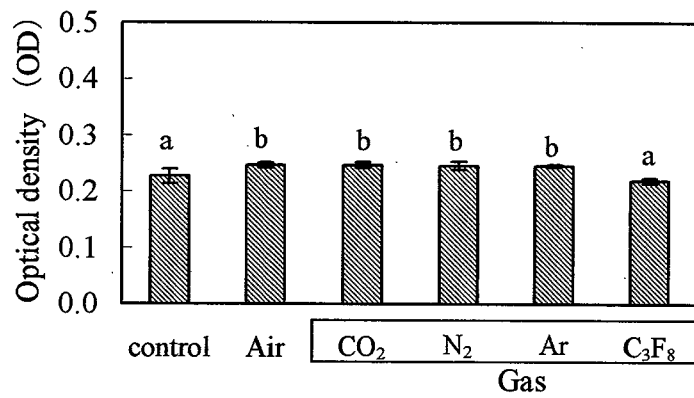


図 14. 細胞培養 1 日後のプラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の増殖能

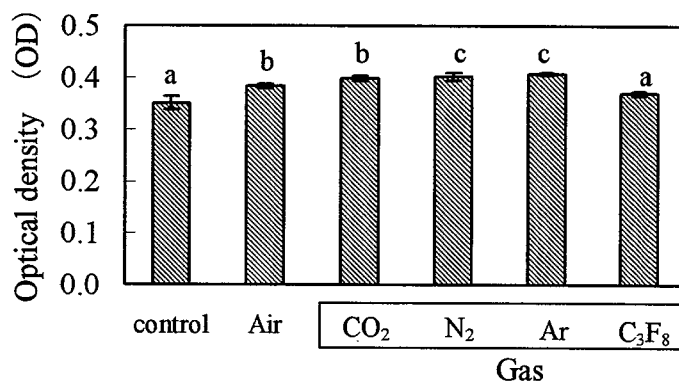


図 15. 細胞培養 3 日後のプラズマ処理した PLLA 表面での MC3T3-E1 細胞の増殖能

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, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ 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).

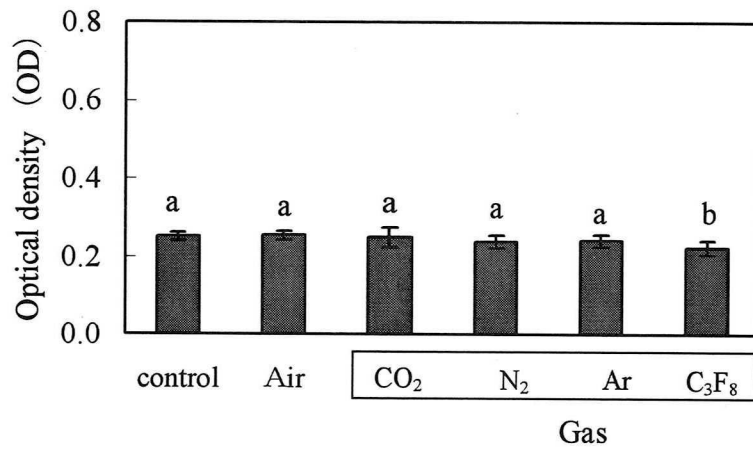


図 16. 培養 1 日後のプラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の増殖能

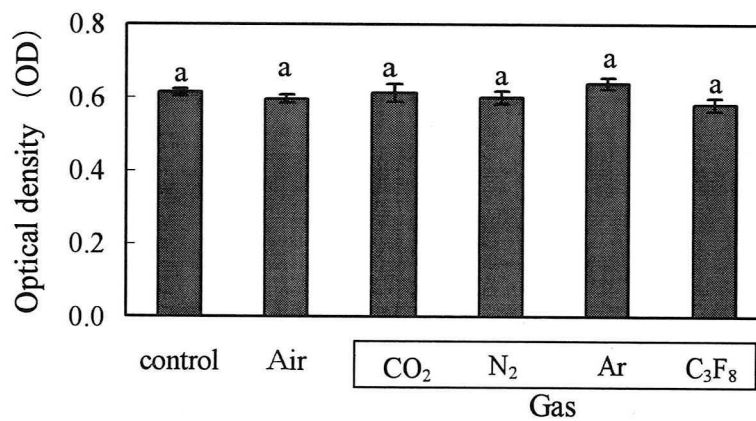
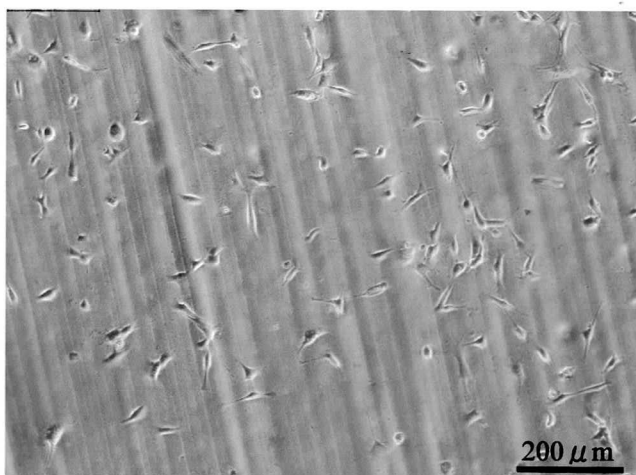
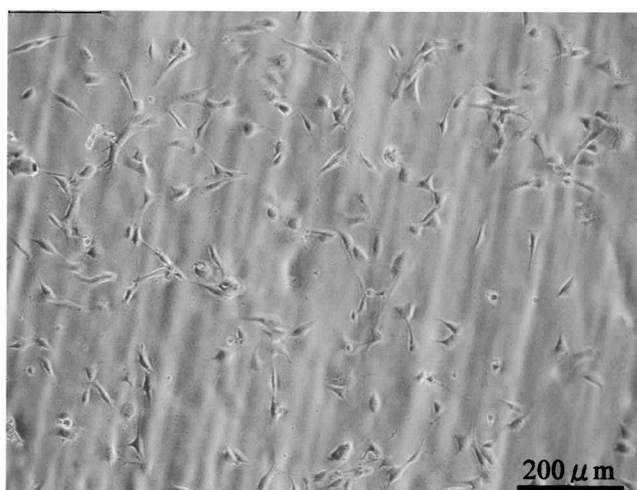


図 17. 培養 3 日後のプラズマ処理した PLLA 表面での HeLa 細胞の増殖能

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⁴⁵⁻⁵⁰⁾。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⁵¹⁾。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 surface (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)}.

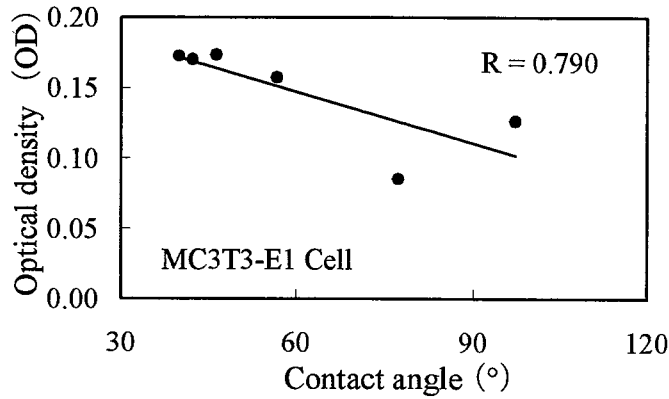


図 19. 接触角と MC3T3-E1 細胞の接着能との関係

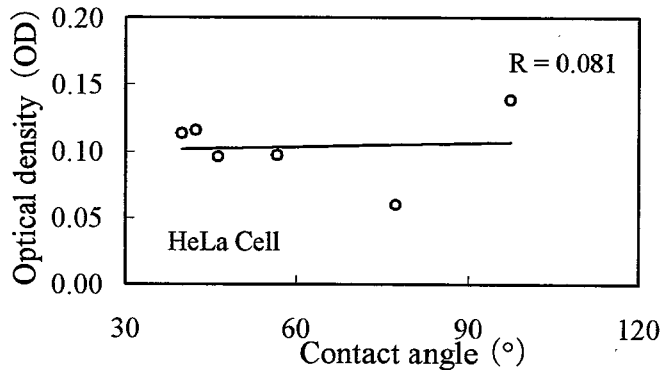


図 20. 接触角と HeLa 細胞の接着能との関係

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^{58,59}). 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^{60,61}).

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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^d , γ_s^h) 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 (γ_s^p) 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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^d , γ_s^h) 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 (γ_s^p) 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.

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

Surface free energy	Cells	
	MC3T3-E1	HeLa
γ_s	0.747**	0.069
γ_s^d	0.761**	-0.028
γ_s^p	-0.213	-0.669**
γ_s^h	0.786**	0.196

*; $p<0.05$ **; $p<0.01$

表8. 原子数比と細胞接着能との相関係数

Atomic percentage	Cells	
	MC3T3-E1	HeLa
N1s	0.427*	0.446*
C1s	-0.781**	-0.320
O1s	0.725**	0.072
O1s/C1s	0.781**	0.320

*; $p<0.05$ **; $p<0.01$

表9. 官能基と細胞接着能との相関係数

Functional group	Cells	
	MC3T3-E1	HeLa
COO	-0.197	0.464*
C=O	0.615**	0.227
C-O	-0.262	-0.384*
C-H	-0.239	-0.713**

*, p<0.05 **; p<0.01

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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^d , γ_s^h) 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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^d , γ_s^h) 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.

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

Surface free energy	Culture conditions			
	MC3T3-E1		HeLa	
	1 D	3 D	1 D	3 D
γ_s	0.573 ^{**}	0.435 [*]	0.404	0.170
γ_s^d	0.553 [*]	0.511 [*]	0.271	0.194
γ_s^p	-0.039	-0.117	0.339	0.226
γ_s^h	0.587 ^{**}	0.465 [*]	0.337	0.121

*;p<0.05 **;p<0.01

表11. 原子数比と細胞増殖能との相関係数

Atomic percentage	Culture conditions			
	MC3T3-E1		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
O1s	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係数

Functional group	Culture conditions			
	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
C-H	-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⁶²⁾。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^{63,64)}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⁶⁵⁾。

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, CO₂, N₂ 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(γ_s)とその成分(γ_s^d , γ_s^h), 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_2 , N_2 , Ar, C_3F_8) 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.

2. 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_2 , N_2 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_3F_8 プラズマ処理した PLLA 表面の細胞接着能は, Air, CO_2 , N_2 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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^d , γ_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, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ プラズマ処理した PLLA 表面の細胞接着能は, Air, CO₂, N₂ 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 (γ_s^p) との間には弱い逆相関が認められた。

4. 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, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ 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 (γ_s) およびその成分 (γ_s^d , γ_s^h), O1s, O1s/C1s 比および C=O 基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, CO₂, N₂ 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, C₃F₈ プラズマ処理した PLLA 表面の細胞増殖能は Air, CO₂, N₂ 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 CO₂, N₂, Ar, C₃F₈ 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。

1. Air, CO₂, N₂ 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、C₃F₈ 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。
2. Air, CO₂, N₂ および Ar プラズマ処理した PLLA 表面の濡れ性向上は、O1s 原子および O1s/C1s 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、C₃F₈ プラズマ処理した PLLA 表面はフッ化物(CF, CF₂ および CF₂O)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。

3. 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(γ_s^p)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, 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.
- 2) 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.
- 3) 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): ドライブ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, Descouts 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-Jin P. 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 Sci* 1998; 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.

