

DLC 膜の光学的特性と細胞増殖との相関性に関する検討

Investigation of relationship between optical properties of DLC film and cell proliferation

○ 日比野麻衣(電機大) 多田晴菜(電機大) 大越康晴(電機大)

平塚傑工(ナノテック) 中森秀樹(ナノテック) 森山匠(堀場製作所)

櫻井正行(堀場製作所) ナタリア ナバトバ ガバイン(堀場製作所)

齋藤秀俊(長岡技科大) 平栗健二(電機大) 福井康裕(電機大)

Mai HIBINO, Tokyo Denki University; Haruna TADA, Tokyo Denki University;

Yasuharu OHGOE, Tokyo Denki University; Masanori HIRATSUKA, Nanotec Corp.;

Hideki NAKAMORI, Nanotec Corp.; Takumi MORIYAMA, HORIBA, Ltd.; Masayuki SAKURAI, HORIBA, Ltd.;

Nataliya Nabatova GABAIN, HORIBA, Ltd.; Hidetoshi SAITOH, Nagaoka University of Technology;

Kenji HIRAKURI, Tokyo Denki University; Yasuhiro FUKUI, Tokyo Denki University

Abstract: Several types of diamond-like carbon (DLC) films were deposited on each polystyrene (PS) dish ($\phi 35\text{mm}$) by plasma enhanced chemical vapor deposition (CVD) and physical vapor deposition (PVD) technique, and mouse fibroblasts (NIH-3T3) cells were seeded on each surface of the DLC film. The cells were incubated at 37°C for 3 days. In our previous works, result of X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) analysis showed cell proliferation depended on C=O ratio at the DLC sample surface. However, XPS analysis must be carried out under required extreme high vacuum. In this study, in order to investigate relationship between optical properties and cell proliferation with simple measurement, refractive index and extinction coefficient of the DLC films were measured by ellipsometry measurement. As a result, it is possible to discriminate cell proliferation of the DLC film by measurement of refractive index and extinction coefficient.

Key Words: DLC, Optical properties, Cell proliferation

1. 背景

近年では、医学、薬学、工学の複合した境界領域分野の技術が、人工心臓、人工歯根、人工関節などの高度医療を切り開いている。特に、新材料の創成による生体材料への応用が医療技術の進歩を飛躍的に向上させている⁽¹⁾。その中の一つである炭素系材料の DLC(diamond-like carbon)膜は、高硬度、耐腐食性、耐摩耗性、摺動性に優れた特性を有する。また、各種成膜手法の開発により抗血栓性、細胞親和性、抗菌性など様々な DLC が提案され医療材料として注目を集めている⁽²⁾。DLC 膜は、ダイヤモンドの sp^3 結合とグラファイトの sp^2 結合が混在するアモルファス構造を有することが良く知られている。この二つの結合比率および膜中の水素含有量は、DLC の物性値を決定する重要な要素である。また、CVD(Chemical Vapor Deposition)法や PVD(Physical Vapor Deposition)法などに大別される成膜手法は数多く、DLC の物性値は、成膜手法を含め成膜条件に大きく依存する⁽³⁾。

そのため、学術的な定義が存在しない DLC は、名前は“DLC”と同じでも、成膜条件によってその物性は大きく異なる。それゆえ、専門知識を有しない DLC 一般ユーザーの立場では、目的の DLC について、適切な成膜方法に関する情報が得られずに十分に活用できない点が問題となっている⁽⁴⁾。特に医療分野では、抗血栓性、細胞親和性、抗菌性を有する DLC が注目されるほかにも、歯科材料、手術器具表面の保護膜としての応用など、一言で DLC と表現するにはあまりにも幅広く、特性が全く異なる DLC が、同一の DLC として誤解されることが多々見受けられる。

これまで我々は、医療材料としての DLC の評価として細胞親和性に注目し、各種成膜手法により任意に作製した DLC に対し、一様に細胞培養実験を行った⁽⁵⁾。その結果、

各種成膜手法により作製した DLC 表面において細胞の増殖率が異なり、細胞増殖と DLC 表面の C=O 結合に、強い相関が得られた。DLC 表面の C=O 結合の定量的な分析は XPS (X-ray photoelectron spectroscopy) 分析が一般的であるが、超高真空下で行うため装置が大掛となり、DLC を実用化する上でより簡易的な評価方法の検討が求められる。

そこで本研究では、DLC の光学的特性の観点から、比較的簡易的に評価が行える分光エリプソメトリ測定により、DLC の屈折率と消衰係数に着目し、細胞増殖との相関性を検討した。

2. 実験方法

2-1 成膜方法

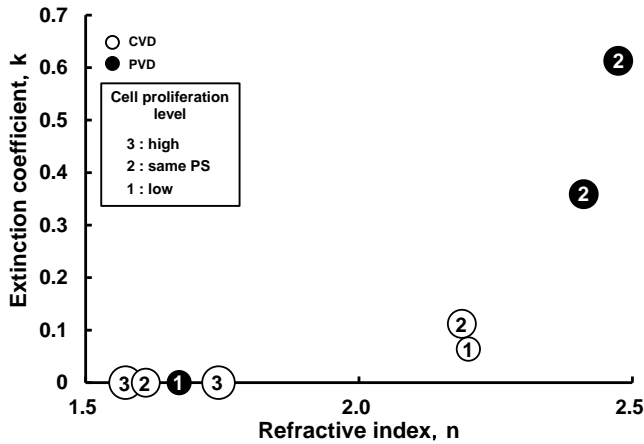
DLC の一般的な成膜手法である CVD 法および PVD 法により、任意の DLC 膜を Polystyrene dish (PS, $\phi 35\text{mm}$) に成膜を施した。

2-2 細胞培養実験

CVD 法、PVD 法にて成膜した DLC に対して、Table 1 の条件で細胞培養試験を行った。

Table 1 Cell culture conditions

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

Fig.1 Relationship of cell proliferation and optical properties⁽⁶⁾

2-3 評価方法

①細胞増殖評価

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

②DLC 膜の表面特性評価

XPS による表面組成評価、AFM (Atomic Force Microscope)による表面粗さ評価を行った。また、表面の濡れ性評価を行うため、 $\theta/2$ 法を用いて接触角を測定した。

③DLC 膜の光学的特性評価

分光エリプソメトリ測定により、DLC 膜の屈折率と消衰係数の測定を行った。

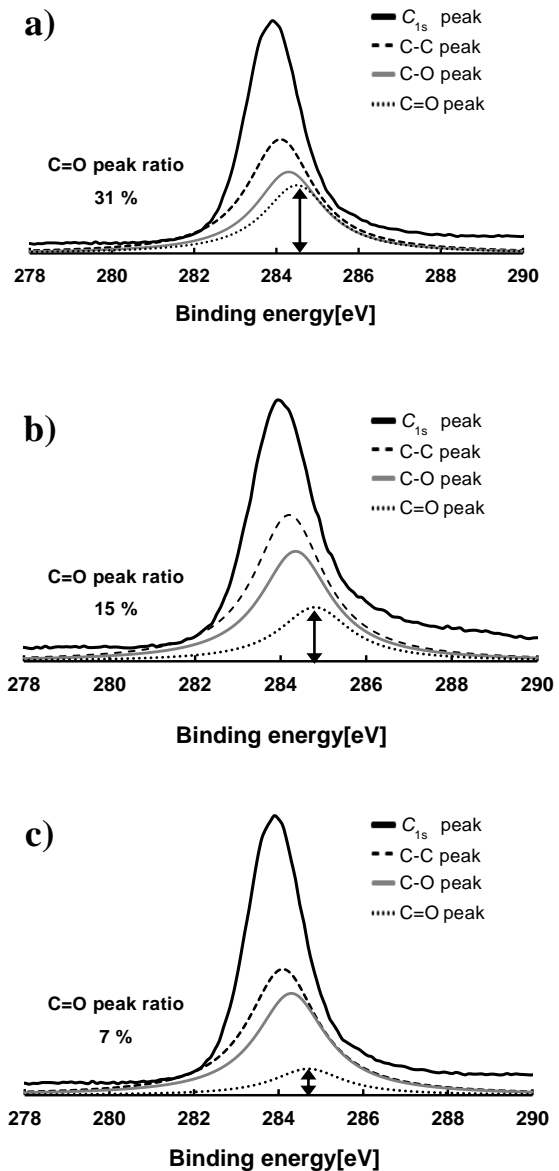
3. 結果

Fig.1 に、分光エリプソメトリによる DLC の細胞増殖性と光学的特性の関係を示す。図中の○は CVD 法により成膜したもの、●は PVD 法により成膜したものとし、細胞増殖の程度は 1~4 段階の大きさで示している。Same PS は DLC 成膜を施していない PS と同等の細胞増殖を示したものである。Fig.1 より、屈折率が 2-2.5、消衰係数が 0.1-0.7 の範囲にある DLC は PS と同等の細胞増殖性を示した。一方、屈折率が 1.5-2.5、消衰係数が 0-0.1 の範囲にある DLC は、細胞増殖性を促進する DLC や抑制する DLC が含まれることが示された。

Fig.2 に、XPS 分析による表面組成評価の結果として、細胞増殖性の程度における DLC 表面の C=O 結合の比率を示す。それぞれの波形の C=O 結合の比率に注目すると、high: 31%, same PS: 15%, low: 7% となり、細胞増殖性と DLC 表面の C=O 結合に相関があることが確認された。

4. 考察

Fig.1 より、DLC の光学的特性と細胞増殖性において、屈折率が 2.0、消衰係数が 0.1 を境界として、PS と同等の細胞増殖性を示す DLC とそれ以外に分けられる事が示唆された。また、Fig. 2 では C=O 結合と細胞増殖性との間に強い相関性が得られた。これらの結果から、これまで DLC の細胞増殖性は、XPS 分析を用いて C=O 結合との相関性について議論が行われてきたが、XPS 分析よりも比較的簡易的に行える分光エリプソメトリ測定によって、屈折率と消衰係数を測定することで、細胞増殖性における DLC の簡易的な評価が可能となることを見込まれた。

Fig.2 C_{1s} XPS spectra of DLC film surface. a) cell proliferation level very high, b) same PS, c) low

5. まとめ

任意の DLC に対し、屈折率と消衰係数に着目し、細胞増殖との関連性を検討した。その結果、これらの光学的特性から、DLC の細胞増殖性を簡易的に評価できることが示唆された。

参考文献

- 平栗健二他, *NEW DIAMOND* **100** (2011), 70-73.
- 大竹尚登監修, *DLC の応用技術* (2007), シーエムシー出版, 236
- 大越康晴他, *NEW DIAMOND* **96** (2010), 45-49.
- 大越康晴他, *NEW DIAMOND* **106** (2010), 41-44.
- M. Hibino *et al.*, *New Diamond Nano Carbons Conference 2012*, (2012) 23.
- 安田和正他, 第 73 回応用物理学会学術講演会 講演予稿集 (2012), 105.