

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06470

研究課題名(和文) 生体活性元素ドーピングしたDLCによる表面コーティング技術のバイオマテリアルへの展開

研究課題名(英文) Evaluation of the enhancement of osteogenesis by Zn-releasing diamond-like carbon film

研究代表者

平栗 健二 (HIRAKURI, Kenji)

東京電機大学・工学部・教授

研究者番号：60225505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：工業的利用価値が高いDLCは、生体内で安定であることが知られている。一方で、亜鉛は骨の石灰化に關与するアルカリホスタファラーゼ(ALP)の産生促進効果があることが注目されている。骨形成を促進する生体材料として生体内でZnを供給する機構を持つZn含有DLC(Zn-DLC)を作製し、ZnとDLCの特性を併せ持つ新規生体材料を開発した。Zn-DLCが骨芽細胞の石灰化促進効果があることを確認した。この過程では、石灰化の促進にはZn-DLCから放出されるZnが骨芽細胞に作用していると考えられる。そこで、Zn放出機構を同定するためにZn-DLCの膜構造を評価した。

研究成果の概要(英文)：Diamond-like carbon (DLC) has a wide range of commercial applications and some types are known to be biologically stable. Zinc (Zn) has received attention because it enhances the production of alkaline phosphatase(ALP), which promotes bone calcification. Therefore, we manufactured a DLC that contains Zn (Zn-DLC) and can supply Zn to biological systems, as a potential biomaterial to enhance osteogenesis. We evaluated film crystallinity using Raman spectroscopy and measured the amount of released Zn using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In addition, we evaluated the effects of Zn-DLC on osteogenesis in vitro. Osteoblasts cultured on Zn-DLC tended to show a greater area of calcification than those cultured on DLC, although no significant differences in ALP activity were observed. These results suggested the possibility that osteogenesis could be enhanced by the Zn that is released from Zn-DLC.

研究分野：電子工学

キーワード：DLCコーティング ドーピング 骨芽細胞 生体親和性 Zn徐放

1. 研究開始当初の背景

(1)DLC (Diamond-like Carbon) は医療デバイスの表面加工技術として盛んに研究が行なわれている。これは、DLC の機械的特性にもならず、構成元素が生体内に存在する元素と類似であることで良好な生体適合性を有することによる。このことから、人工心臓や人工血管、人工関節などの医療デバイスにコーティングすることで生体内に長期間の設置を可能にすることができると期待されている。

(2)骨粗鬆症患者は年々増加している。そのため、代謝の改善薬、人工骨材料、骨折治療器具などの新たな製品の開発が望まれている。最近では、骨代謝に重要な役割を果たしている生体必須金属として亜鉛 (Zinc : Zn) が注目を集めている。

2. 研究の目的

本研究では、DLC と Zn を組み合わせて Zn を含む DLC 膜 (Zn-DLC) を開発した。この Zn-DLC から Zn が徐放される物性を付与し、骨化促進の効果を検証した。Zn-DLC の評価は、膜構造評価に加えて、徐放機能、骨芽細胞による石灰化試験 (*in-vitro*) 試験を行った。膜構造と徐放機能の関連性と Zn-DLC の骨形成促進効果について調査した。

3. 研究の方法

(1) Zn-DLC は反応性スパッタリング法を用いて成膜を行った。成膜装置の概略図を図 1 に示す。反応性ガスとして C₂H₂、スパッタリングガスとして Ar を使用した。細胞培養試験用の成膜は 24well plate (PS 製) に対して行い、膜物性評価用には Si 基板に対して成膜を行った。実験条件である電力パルスのデューティ比、電源電力、ガス流量比を変えることで、膜の物性を変化させていくことができる。

本研究では、Zn 徐放量が適切な量となるように設定するため表 1 に示す条件で成膜を行った。成膜条件によってスパッタリング効率を変化させて、Zn が含まれる量が少ない試料と多い試料を用意した。電圧のデューティ比が 40% の試料を Zn-DLC(40)、100% の試料を Zn-DLC(100) と示す。比較試料として Zn ターゲットを設置せずに成膜した通常の DLC を Normal DLC と明記した。

表 1 試料の作製条件

試料名	ガス流量比 (C ₂ H ₂ /Ar)	スパッタ電圧 (V)	スパッタ電流 (A)	周波数 [kHz]	デューティ比 (%)
Normal DLC	1 / 0	1000	4.3	0.5	10
Zn-DLC (40)	1 / 1	550	1.52	1	40
Zn-DLC (100)	1 / 1	750	1.4	DC	100

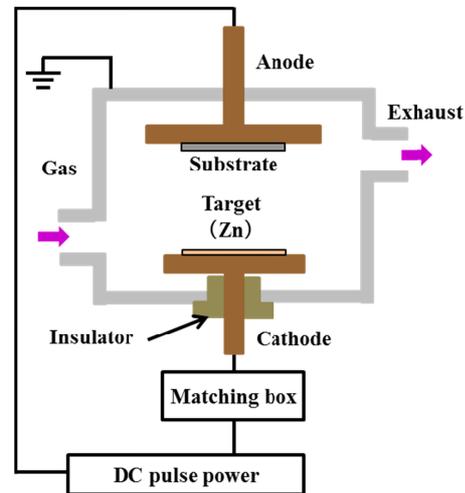


図 1 Zn-DLC 製造装置の概略図

(2)各試料から徐放される Zn 量を把握するために Zn 徐放試験を行った。24well plate 内に Zn-DLC(40)、Zn-DLC(100)および Normal DLC を成膜した試料を浸漬して測定した。具体的な手順は、細胞培養液 (MEM-α) を 1well あたり 500μL 加えて試料を浸漬させて 96 時間留置する。その後、溶液を抽出し ICP 質量分析 (ICP-MS) で定量した。

(3)Zn-DLC が細胞の石灰化に与える効果を評価するため、骨芽細胞を用いた石灰化試験 *in-vitro* 試験を行った。石灰化評価試験の手順は次の通りである。マウス頭蓋由来骨芽細胞株 (MC3T3-E1) をそれぞれの 24well plate 試料上で細胞培養を行う。その後、Alizarin red 染色によって、細胞の石灰化箇所を染色する。染色化された面積によって石灰化の進度を評価した。

(4)Zn-DLC の Zn 徐放過程を検討するため、各試料の組成分析を行った。Normal DLC と Zn-DLC の構造について着目し、徐放する前後でそれぞれの深さ方向の組成分析をすることで、Zn 量の変化についても明らかにした。

膜物性評価用に成膜した Si 基板を用いて表面組成を分析した。表面の結合状態の分析を X 線光電子分光法 (XPS) によって行った。分子構造解析は Raman 分光法によって評価した。さらに、膜内部の原子分布をオージェ電子分光法 (AES) によって測定した。

4. 研究成果

(1) ICP-MS によって各試料から徐放された Zn 濃度を図 2 に示す。各試料における Zn 徐放量はそれぞれ Normal DLC が 0 ppm、Zn-DLC(40) が 0.3 ppm、Zn-DLC(100) が 5.2 ppm であった。Normal DLC は成膜時に Zn

ターゲットを設置しない条件で成膜を行ったために Zn 量が測定分解能以下であったと考えられる。Zn-DLC(40)と Zn-DLC(100)では、成膜時のデューティ比に応じて Zn 量が多くなっている傾向がある。100%の場合のスパッタデューティ比で作製した試料からの Zn 徐放量は 40%に対し、約 18 倍となった。

デューティ比だけを考慮すると Zn 量は 2 倍程度の違いと推定されるが、スパッタリング電圧が Zn-DLC(100)では 750V と高めであったことも影響していると考えられる。このように、ICP-MS による各試料からの Zn 徐放量を測定することで、それぞれの膜から徐放される Zn 量が同定できた。計算からは、浸漬溶液 1mL に対して、0.3ppm では 0.3 μ g の Zn が徐放され、5.2ppm では 5.2 μ g の Zn が試料から放出されていると考えられる。

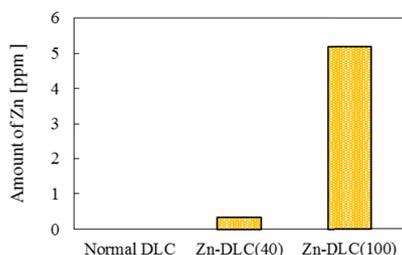


図 2 ICP-MS による各試料の Zn 徐放量評価

(2)各試料における MC3T3-E1 細胞を 3 週間培養した後に、Alizarin red によるカルシウムの沈着箇所を染色した。well 内の赤色点は、染色によって石灰化を可視化したカルシウムの沈着である(図 3)。すべての試料でカルシウムの沈着が確認できており、石灰化が実現できていることが分かる。この石灰化面積が広がっている試料ほど骨形成が進んでいると考えることができる。

そこで、石灰化した面積を比較するために、1well の面積(2cm²)に対して染色されている箇所の面積の割合を画像解析ソフトで数値化した(図 4)。図 4 より、比較試料である Normal DLC に対して、Zn を含んでいる試料である Zn-DLC(40)、Zn-DLC(100)は石灰化面積が顕著に広がっていることが確認できる。Normal DLC の石灰化に対して Zn-DLC(40)では、Zn 徐放量に比例して石灰化面積が大きくなっていることが確認できた。Normal DLC と Zn-DLC(100)において、同様の環境下で 3 週間培養することで、石灰化する面積比が、1well あたり 3.7%の増加が確認できた。

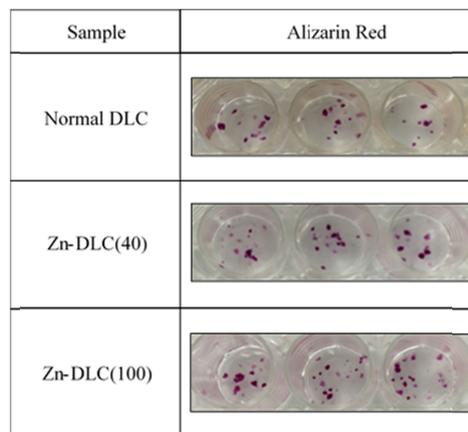


図 3 各試料上において MC3T3-E1 をアリザリンレッド染色した様子

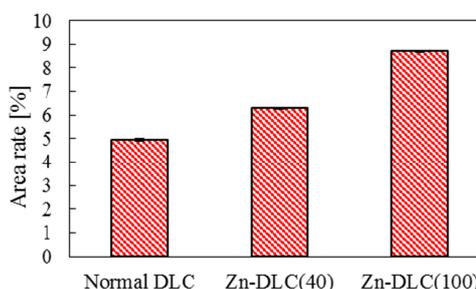


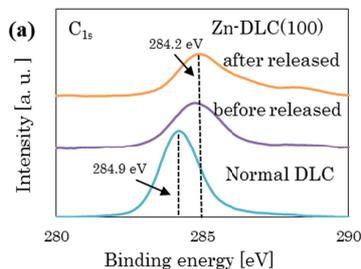
図 4 各試料上での MC3T3-E1 のアリザリンレッド染色面積

(3) XPS によって Zn-DLC(100)および Normal DLC の膜表面の結合状態を分析した結果を図 5 に示す。まず、浸漬前の Normal DLC と Zn-DLC(100)を比較する。C_{1s} の結合エネルギー帯域において Normal DLC(284.2.eV)と Zn-DLC(100)(284.9 eV)のいずれも明確なピークが確認できた。

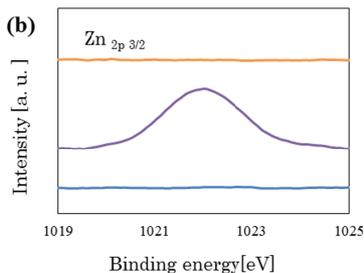
Zn_{2p_{3/2}} のエネルギー帯域(1021 eV 付近)において Normal DLC では結合が確認できなかった。一方、浸漬前の Zn-DLC(100)では、Zn_{2p_{3/2}} のエネルギー帯域のピークが確認された。Zn-DLC(100)の徐放前後で比較を行う。浸漬前と浸漬後の両方の試料で C_{1s} の結合エネルギー帯域における同様のピークが確認された。このことから、浸漬前後で Zn-DLC の膜構造が変化した可能性は低い。

次に、Zn_{2p_{3/2}} のエネルギー帯域に注目して比較を行う。図 5(b)において徐放前である試料からは Zn_{2p_{3/2}} のピークが明確に確認できた。しかし、徐放後のスペクトルでは Zn_{2p_{3/2}} のピークが消失していることが分かった。

これは、浸漬によって Zn が膜中から徐放されたために膜の表面結合状態の解析では確認できなくなったことに起因していると考えられる。



(a) Zn-DLC(100)とNormal DLCのC_{1s}ピーク



(b) Zn-DLC(100)とNormal DLCのZn_{2p3/2}ピーク

図5 各試料における徐放試験前後のXPSスペクトル

(4)XPS 分析同様、Normal DLC と Zn-DLC(100)を Raman 分光法によって評価した。DLC において一般的に確認される G band と D band の有無について注目して評価を行った。この結果として、Normal DLC と浸漬前の Zn-DLC(100)で G band と D band の両方が確認された。今回使用した Normal DLC と Zn-DLC(100)は一般的な DLC と同様な構造をしていることが示唆された。

さらに、浸漬後の Zn-DLC(100)においても同様の G band ピークと D band ピークが確認された。このことから、徐放の前後では結晶性には大きな変化は起こっておらず、DLC としての構造を徐放前後で保ち続けていることが示唆された。

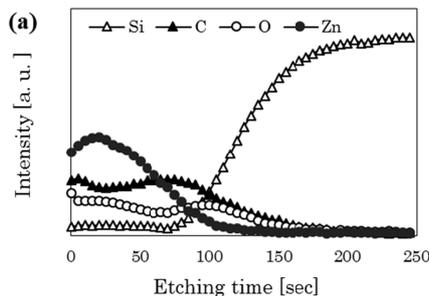
(5)Zn-DLC(100)の膜内部における元素分布を徐放前後の膜構造を解析することで Zn の徐放メカニズムについて検討した。AES 分析を膜表面から基板内部方向へ Ar のイオン照射によってエッチングすることで深さ方向の情報を獲得した。エッチング条件は、1cycle あたり 5sec として、合計 50cycle 行った。総エッチング時間は 250sec である。測定結果を図 6 に示した。

図 6 (a)より、Zn-DLC(100)の徐放前の膜内部における元素の分布を確認した。Si は膜中には含まれていないためエッチング時間 0~100 sec 付近では確認されなかった。100 sec 付近から Si の検出量の増加が確認される。これは、エッチングが進むことで Si 基板が露出しているためであることが考えられる。このことから、150 sec 付近のエッチングに

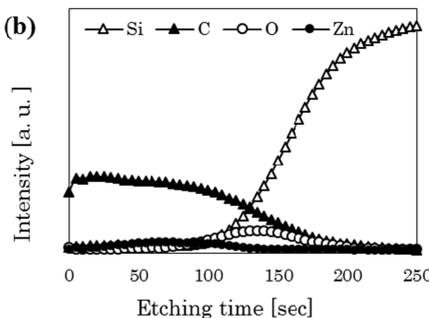
相当する距離が基板界面と推定される。

今回は膜厚が約 15nm であるのでエッチング速度は 0.1 [nm/sec]と推定される。また、C の元素分布についても 150 sec 付近まで存在していることから推定される。Zn 元素については、100 sec 付近まで存在が確認されており、基板との界面まで存在していたことが示唆された。その分布は 0~50 sec で一定量以上がほぼ均一に存在するが、50~100 sec で減衰していく傾向が確認されている。

図 6 (b)に Zn-DLC(100)の徐放後の膜内部における元素分布について示した。徐放前と同様に、Si の検出は 100 sec 付近以降増加している。C についても徐放前と同様に、界面付近と考えられる 150 sec までは存在していたことが示唆される。しかし、Zn 元素は、徐放前の測定と異なり、徐放後の試料ではほとんど検出されていないことが確認できる。これは、Zn が徐放されたために膜中から Zn が消えていることが示唆される。また、深さ方向の 50~100 sec 付近、すなわち膜の奥に存在していた Zn も徐放されていることが確認できる結果となった。Zn が徐放された試料(浸漬後)のエッチング速度は膜界面のエッチング時間(浸漬前:100 sec, 浸漬後:125 sec)から 25%程度増加したと推定される。



(a) 徐放前の深さ方向に対する元素分布



(b) 徐放後の深さ方向に対する元素分布
図 6 Zn-DLC(100)の徐放試験前後の深さ方向の元素分布

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Junichi Katouno, Kouki Fujioka, Shunta Kidera, Yasuhumi Mabuchi, Keisuke Sato, Yasuharu Ohgoe, Yoshinobu Manome, Masanori Hiratsuka, Hideki Nakamori, Hideki Masuda, Hiroshi Honda, Kenji Hirakuri, Evaluation of the enhancement of osteogenesis by Zn-releasing diamond-like carbon film, Diamond and Related Materials, 査読有, 77, 2017, 131-136

〔学会発表〕(計 7 件)

上遠野 惇市、平栗健二他、Zn 含有 DLC からの Zn 放出の溶媒による影響、第 31 回ダイヤモンドシンポジウム、2017

上遠野 惇市、平栗健二他、骨形成効果を持つ Zn 含有 DLC の膜構造評価、第 30 回ダイヤモンドシンポジウム、2017

木寺 俊太、平栗健二他、バイオマテリアル応用に向けた Zn 放出型 DLC 膜の特性評価、第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017

Junichi Katouno, Kenji Hirakuri et al, Enhancement of osteogenic on Zn release with Zn doped DLC film coating, the 5th Asia-Pacific International Congress on Engineering & Natural Sciences, 2016

Junichi Katouno, Kenji Hirakuri et al, Structural Investigation of Zn Doped Diamond-Like Carbon Films, International Conference on Engineering and Applied Sciences, 2016

馬淵 康史、平栗健二他、Zn 溶出型 DLC 膜の骨芽細胞株に対する毒性評価、第 54 回日本生体医工学会大会、2015

Mabuchi Yasuhumi, Kenji Hirakuri et al, Cytotoxicity of Zn-doped DLC coating for osteoblasts, International Conference on Diamond and Carbon Materials, 2015

6 . 研究組織

(1)研究代表者

平栗 健二 (HIRAKURI, Kenji)
東京電機大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：60225505

(2)研究分担者

馬目 佳信 (MANOME, Yoshinobu)
東京慈恵会医科大学・医学部・教授
研究者番号：30219539

(3)連携研究者

研究者番号：

(4)研究協力者

大越 康晴 (OHGOE, Yasuharu)
藤岡 宏樹 (FUJIOKA, Kouki)
平塚 傑工 (HIRATSUKA, Masanori)
坪井 仁美 (TUBOI, Hitomi)
中森 秀樹 (NAKAMORI, Hideki)

益田 秀樹 (MASUDA, Hideki)

本田 宏志 (HONDA, Hiroshi)

馬淵 康史 (MABUCHI, Yasufumi)

上遠野 惇市 (KATOUNO Junichi)

木寺 俊太 (KIDERA, Shunta)

齋藤 一拓 (SAITOU, Kazuhiro)