

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：32657

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04943

研究課題名(和文)窒素含有DLCの細胞接着促進および生体内における内膜化に及ぼす物性効果の解明

研究課題名(英文)Effect of N-containing DLC on cell adhesion and intimal proliferation in in-vivo test

研究代表者

大越 康晴(OHGOE, YASUHARU)

東京電機大学・理工学部・准教授

研究者番号：10408643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：ダイヤモンド状炭素(DLC: Diamond-like Carbon)は生体適合性被膜処理として実用化に向けた開発が飛躍的に進展し、近年では、窒素、酸素、フッ素などの第3元素をドーブし、使用用途に特化した高機能化が図られている。本研究では、窒素含有DLC(N-DLC)の基本構造(散乱長密度およびsp²構造比率)に対し、細胞接着および増殖性を表面特性として評価した。その結果、窒素含有によって散乱長密度およびsp²構造比率が容易に制御可能となり、これに伴って、表面層の酸素官能基形成が変化することで、細胞接着・増殖性および内膜化が表面機能として制御されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

窒素含有ダイヤモンド状炭素(N-DLC)膜の細胞接着・増殖機能は、膜の基本構造である散乱長密度およびsp²構造比率に依存し、窒素含有によってこれらを促進または抑制することを可能とした。従来、細胞を始めとする表面機能について、DLCは個々の表面物性に限定して議論されてきたが、基本構造に関する評価軸を導入することで、今後、不純物含有も含め、各種DLCの細胞親和性に関する高機能化の基礎的な指標を得た。

研究成果の概要(英文)：DLC film has been studied to apply for a wide variety of biologically compatible materials. Additionally, several attempts were made to enhance surface functional performance by doping elements, such as nitrogen, oxygen, and fluorine, into the films. Biological response on the DLC films was influenced by surface conditions associated with film structure. In this study, for film structure and compositional effects of nitrogen containing DLC (N-DLC) film on cell affinity, behavior of hydrogen in the film was investigated. The scattering length density (SLD) of the surface layer was increased accompanying with nitrogen containing. Incorporation of nitrogen to DLC showed rises of sp² carbon ratio. As a result, it was observed that the nitrogen containing of the DLC film accompanying with replacement of hydrogen showed high influence on the surface layer of the film structure and cell proliferation.

研究分野：薄膜物性

キーワード：ダイヤモンド状炭素膜 細胞親和性 窒素含有

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2000年代に入り、ダイヤモンド状炭素 (DLC: Diamond-like Carbon) は生体適合性被膜処理として実用化に向けた開発が飛躍的に進展している。現在 DLC は、切削工具や機械部品をはじめ、バイオトライボロジを中心とした生体適合性材料まで広く展開されている炭素系非晶質薄膜材料である。しかし、DLC の物性的な定義は、膜中のダイヤモンド結合成分: 10~70%、水素含有量: 0~50 atm%、密度: 1.5~3.0 g/cm³ と幅広く、その物性は千差万別である[1-5]。更に近年では、抗血栓性、抗菌性、細胞親和性といった特定の特性を付与するために、窒素、酸素、フッ素、シリコン、銀などの第3元素をドーピングし、使用用途に特化した高機能化が図られている[2]。それ故、多様化した DLC には、第3元素のドーピングに伴う水素含有量や膜密度といった DLC の骨格 (基本構造) と、抗血栓性、抗菌性、細胞親和性等の表面機能を直接検討し、DLC の生体適合性に関する膜物性の生物学的な指標を得ることが希求されている。

2. 研究の目的

本研究では、窒素含有 DLC (N-DLC) の基本構造 (散乱長密度および sp² 構造比率) に対し、細胞接着および増殖性を表面特性として評価する。窒素含有効果、つまり、膜の基本構造の違いが細胞接着・増殖に与える影響を明らかにし、従来、表面物性のみで評価されてきた DLC に、基本物性を指標とした評価軸を導入する。

3. 研究の方法

本実験では、CH₄ と N₂ の混合ガスを原料として高周波プラズマ化学気相成長 (CVD: Chemical Vapor Deposition) 法により、N-DLC を成膜した。原料となる混合ガス (CH₄+N₂) の総流量に対し、N₂ 流量比をパラメータとして基本構造を変化させた。そして、成膜した N-DLC の物性評価として、散乱長密度については J-PARC MLF の BL 17 (偏極中性子反射率形「写楽」) を用いた中性子反射率測定 (NR: Neutron Reflectometry)、sp² 構造比率についてはタイ王立シンクロトロン光研究所の BL 3.2Ua を用いた X 線吸収微細構造 (NEXAFS) 分析を行い、窒素含有に伴う N-DLC 膜中の表面層と膜内部の構造状態を評価した。これと合わせて Raman 分光分析による N-DLC の膜構造評価および、X 線光電子分光測定 (XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy) による表面層の sp² 構造比率と酸素官能基を測定し、膜の基本構造と表面状態との相関性を評価した。

細胞接着評価では、Polystyrene 製細胞培養用プレート (PS-dish 培養表面) に成膜し、NIH-3T3 細胞による細胞接着・増殖評価を行った。72 時間培養において細胞の増殖性を観察し、窒素含有による N-DLC の膜構造の変化が細胞機能に与える影響について評価した。

4. 研究成果

図 1 に NR 測定から求めた N-DLC の深さ方向に対する散乱長密度 (SLD) プロファイルを示す。窒素混合によって、N-DLC 表面層の SLD は膜内部と比べ増加し、特に、N₂ 流量比 40% で最大となった。一方、N₂ 流量比 60% では、40% と比べ SLD が小さい表面層が形成されていることが示された。また、図 2 に、N-DLC の基本構造として、NEXAFS スペクトルと Raman スペクトルを示す。NEXAFS スペクトルの C K-edge については、いずれも * (C=C): 284.9 eV 付近に由来するピークが検出された。成膜中の窒素含有によって、膜の基本骨格となる sp² 構造比率が変化することが確認された。特に、N₂ 流量比が 0 から 40% に変化すると sp² 比率は増加し、更に 60% では減少する構造となった。また、Raman スペクトルでは、N₂ 流量比が 40% 以上の増加では、G-peak が一様に高波数側にシフトしていることから、DLC 膜中の水素が、窒素含有によって脱離し、窒素に置換されたものと考えられる。

これらに加えて、N-DLC を成膜後、X 線電子分光 (XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy) にて表面分析を行った。N₂ 流量比の違いによる N-DLC 表面の Carbon 1s スペクトルを測定し、取

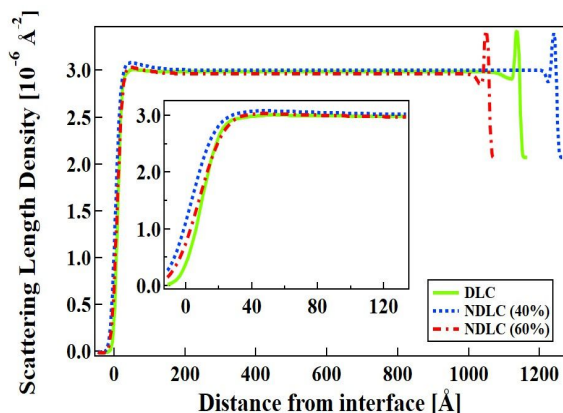


図 1 NDLC 散乱長密度のプロファイル (深さ方向)

得した Carbon 1s スペクトルを C-C sp^3 , C-C sp^2 , C-O, C=O, C-N のスペクトルに波形分離し、窒素含有による表面構造・表面組成の変化を評価した。これらの結果を図 3 に示す。図 3 (a)より、NEXAFS 分析と同様に、窒素含有によって、N-DLC 表面の sp^2 構造比率が変化することが確認された。この時、 sp^2 構造比率は N_2 流量比の増加と共に線形的に増加するのではなく、 N_2 流量比 40% で増加した後、60% では低下する傾向が示された。次に、図 3 (b)に C-O および C=O 基の比率の変化を示す。窒素含有によって C-O 比率は増加したが、 N_2 流量比 40~60% では一定となる傾向が示された。一方、C=O 基は窒素含有によって変化し、窒素流量比 60% の時に最大となった。図 3(c)に、C-N 比率の変化を示す。C-O 比率の結果と同様に、 N_2 流量比が 40 と 60% については顕著な差はなく、その後、 N_2 流量比 80% の時に C-N 比率が最大となる傾向が示された。

これらの結果は、水素よりも SLD が大きい窒素が、水素との置換によって C-N 結合が増加し、 N_2 流量比 40% で SLD の大きい層が表面に形成された為と考えられる。一方、 N_2 流量比 60% では、膜の骨格に対し窒素混合が過剰となることで、成膜中において、窒素によるエッチング効果が現れ、その結果として、N-DLC 表面層に欠陥が生じ、SLD が減少すると考えられる。これにより、 N_2 流量比 60% 表面は、大気暴露による酸素終端によって酸素官能基がより多く形成されたと考えられる。これらの結果より、DLC に窒素含有を行うことで、膜中の水素が窒素に置換され、基本構造である sp^2 結合比率と表面状態を反映する酸素官能基の形成を制御し得ることが示された。

図 4 に、各窒素混合条件における N-DLC の細胞接着評価 (72 時間培養) の結果を示す。図 4

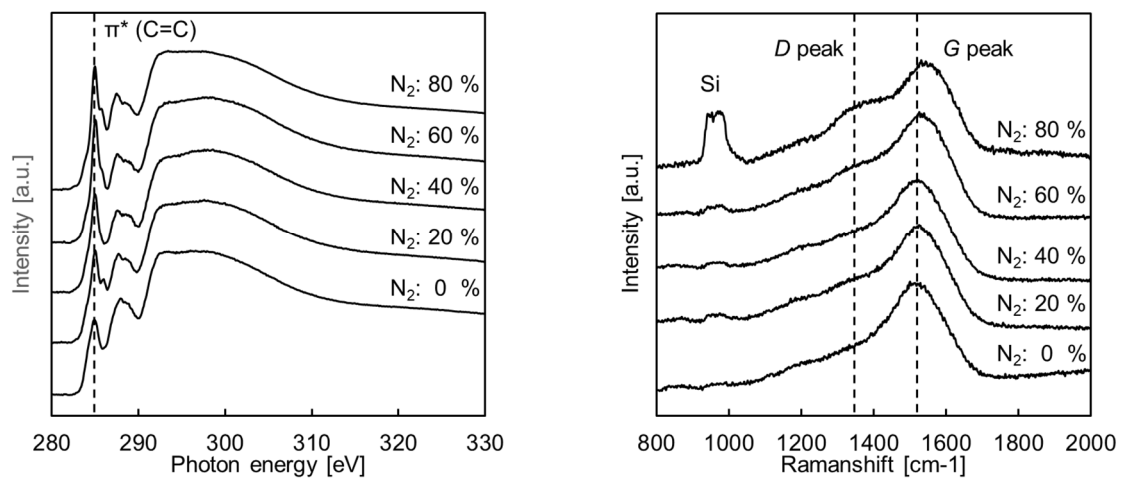


図 2 N_2 流量比における N-DLC の基本構造変化

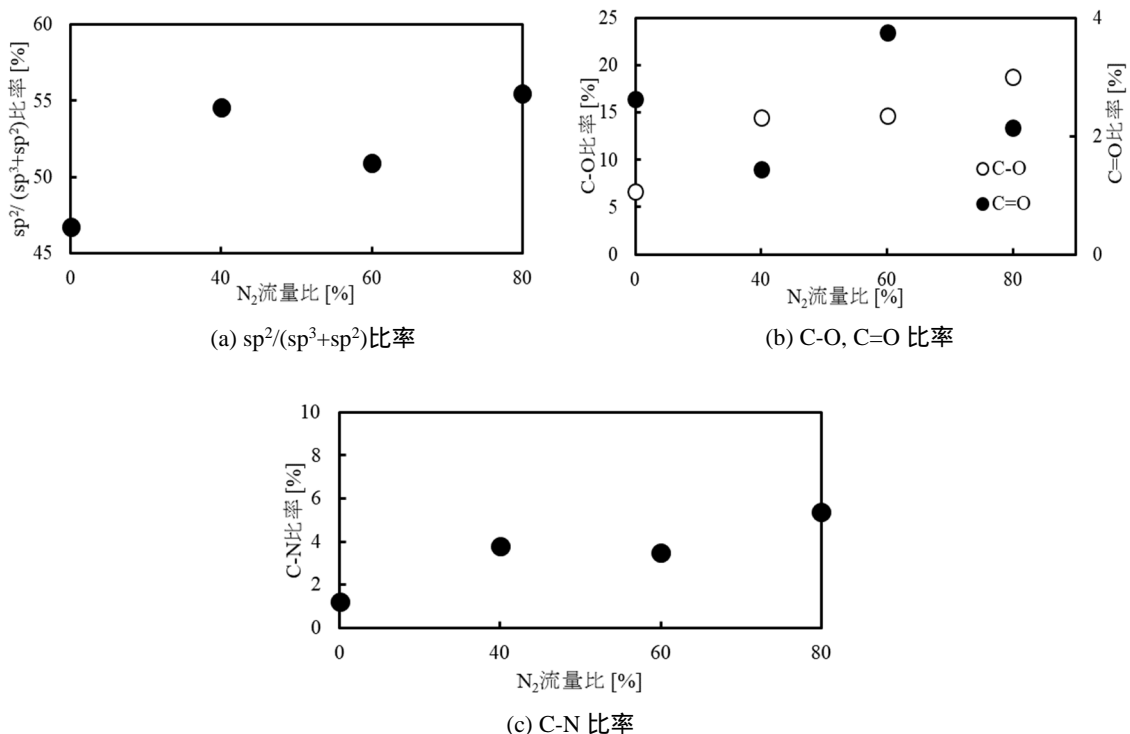


図 3 N_2 流量比における N-DLC の表面組成変化

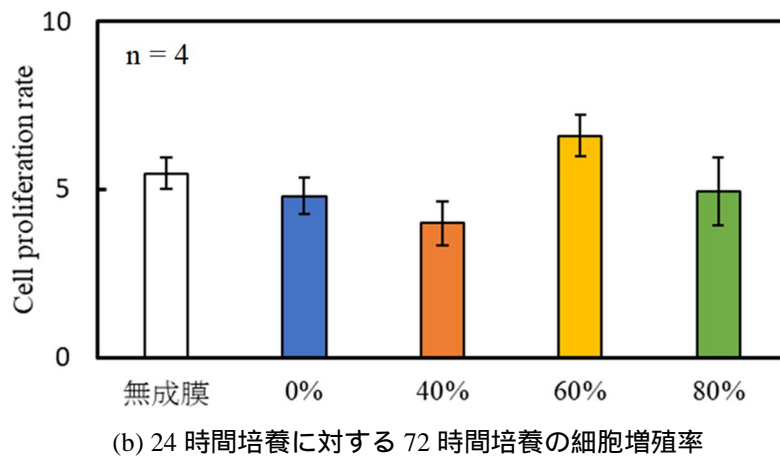
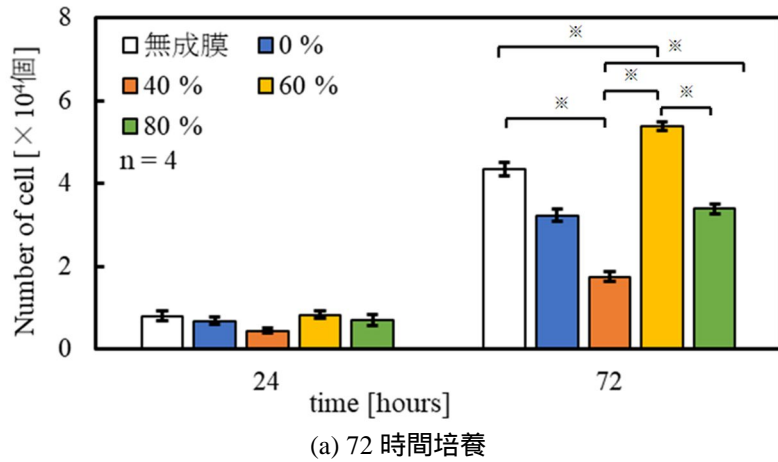


図4 N₂ 流量比における N-DLC 表面の細胞増殖性評価 (NIH-3T3 細胞)

で得られた各 N-DLC に対し、分散分析及び Tukey 法による群数内の多重比較を行った。24 時間培養において Tukey による多重比較検定を行った結果、無成膜 (PS-dish) 及び N₂ 流量比 0, 40, 60, 80 % の間の接着細胞数に有意な差は得られなかった。一方、72 時間後の細胞接着数では、分散分析より、0.05 % 有意であることが確認され、Tukey による多重比較の結果では、無成膜 (PS-dish) と N₂ 流量比 40 %, 無成膜 (PS-dish) と N₂ 流量比 60 %, N₂ 流量比 40 % と 60 %, N₂ 流量比 40 % と 80 %, N₂ 流量比 60 % と 80 % 間で有意差があることが判明した。この結果より、N₂ 流量比 40 % の N-DLC は、無成膜 (PS-dish) 及び N₂ 流量比 60, 80 % の細胞接着数との間で有意な差が確認され、N₂ 流量比 40 % の N-DLC は細胞接着が抑制される表面であることが示唆された。また N₂ 流量比 60 % は、N₂ 流量比 0, 40, 80 % の細胞接着数との間で有意な差が確認され、細胞接着を促進する表面であることが示唆された。以上の結果から、N₂ 含有によって、72 時間培養の細胞接着数には有意な差が見られ、細胞接着が促進あるいは抑制される表面が形成されることが示唆された。

細胞接着・増殖への N-DLC の基本構造および表面物性の寄与としては、sp² 構造内部の自由電子による影響と酸素官能基 (C-O 基および C=O 基) による影響が考えられる。N₂ 流量比 0 % では他の N₂ 流量比の N-DLC と比べ酸素官能基が少なく、細胞接着・増殖に対する酸素官能基の寄与は小さいと考えられる。故に、細胞接着・増殖への寄与は、sp² 構造内部の自由電子に依存すると考えられる。

一方、N₂ 流量比 40 % では、sp² 構造内部の自由電子による影響と酸素官能基による影響に加え、C-N 基による影響が考えられる。N₂ 流量比 40 % では、NR 測定において SLD が大きい表面が形成されると共に、sp²/(sp²+sp³) 比率が他の N-DLC よりも高く、酸素官能基と C-N 結合の比率は N₂ 流量比 0 % よりも増加した。即ち、細胞接着・増殖への影響として、特に SLD と sp² 構造比率の変化が寄与したと考えられる。故に N₂ 流量比 40 % では、無成膜 (PS-dish) や、他の N-DLC と比べ、細胞接着・増殖が抑制された結果になったと考えられる。

N₂ 流量比 60 % では、N₂ 流量比 40 % と同様に、SLD および sp² 構造内部の自由電子による影響と酸素官能基による影響に加え、C-N 基による影響が考えられる。N₂ 流量比 60 % では、N₂ 流量比 40 % と比べ SLD および sp²/(sp²+sp³) 比率が低下し、sp²/(sp²+sp³) 比率は他の N-DLC と比べ中程度であった。また、酸素官能基は最も多く、C-N 比率は N₂ 流量比 0 % よりも増加しているものの、N₂ 流量比 40 % と同等であることが確認された。この結果から、窒素量比 60 % では、sp² 構造内部の自由電子および C-N 結合による細胞接着抑制効果よりも、窒素量比 40 % と比べ SLD の低下に伴う酸素官能基の増加によって、細胞接着・増殖が他の N-DLC と比べ促進されたと考え

られる。

N₂ 流量比 80 % では、sp² 構造内部の自由電子による影響と酸素官能基による影響に加え、C-N 基による影響が考えられる。sp²/(sp²+sp³) 比率が他の N-DLC と比べ N₂ 流量比 40 % と同等で最大であり、酸素官能基は N₂ 流量比 40 % よりも多く、更に、C-N 比率も他の N-DLC と比べ最大であった。即ち、N₂ 流量比 80 % では、窒素混合によって、sp² 構造が増加したと考えられる。細胞接着・増殖は N₂ 流量比 40 % と同様に抑制傾向にあるものの、酸素官能基および C-N 基の増加による促進の影響も受け、その結果として N₂ 流量比 40 % よりも細胞の接着・増殖が促進されたと考えられる。

N-DLC の物性と細胞親和性との関係では、窒素含有による SLD および sp² 構造の変化に伴い、N-DLC の表面機能として、細胞接着・増殖特性が変化することが示された。これらの結果より、DLC への窒素含有によって、基本物性となる SLD および sp²/(sp²+sp³) 構造比率と、表面特性となる酸素官能基および C-N 基の比率が制御可能となり、生体内環境も含め、細胞接着・増殖性および内膜化を評価し得る評価軸となることが示唆された。

引用文献

1. T. Mayama, M. Hiratsuka, H. Nakamori, A. Homma, K. Hirakuri, Y. Ohgoe, "Effect of oxygen plasma treatment on film structure for different types of DLC films", Transactions of the Materials Research Society of Japan Vol. 43, No. 5, 275-278, 2018.
2. 大越康晴, 平栗健二, "DLC の生体親和性評価 (ISO 規格のための評価)", NEWDIAMOND 123 号, 28-31, 2016.
3. Y. Ohgoe, K. K. Hirakuri, H. Saitoh, T. Nakahigashi, N. Ohtake, A. Hirata, K. Kanda, M. Hiratsuka, Y. Fukui, "Classification of DLC films in terms of biological response", Surface & Coatings Technology Vol. 207 No. 1, 350-354, 2012.
4. E. Marin, A. Lanzutti, M. Nakamura, M. Zanocco, W. Zhu, G. Pezzotti, F. Andreatta, Corrosion and scratch resistance of DLC coatings applied on chromium molybdenum steel, Surface & Coatings Technology 378, 124944, 2019.
5. J. Robertson, "Diamond-like amorphous carbon", Materials Science and Engineering R37, 129-281, 2002.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1 . 発表者名 Y. Ohgoe, T. Fukuhara, N. Miyata, S. Tunmee, P. Kidkhunthod, T. Yaguchi, A. Homma, K. Hirakuri
2 . 発表標題 Effects of foreign element contents on functional a-C:H film structure for biomedical applications
3 . 学会等名 ISSIB 2019 (7th International Symposium on Surfaces and Interfaces for Biomaterials (招待講演) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 Y. Ohgoe, S. Tunmee, U. Rittihong, C. Euaruksakul, H. Nakajima, M. Hiratsuka, H. Nakamori, T. Yaguchi, A. Homma, K. Hirakuri
2 . 発表標題 Relationship between sp3/sp2 ratio and surface functionalities in various types DLC films for biological response
3 . 学会等名 ACXAS 2019 (ASIAN Conference on X-ray Absorption Spectroscopy 2019) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 N. Tatsumi, Y. Ohgoe, N. Miyata, T. Miyazak, T. Yaguchi, K. Hirakuri, A. Homma, H. Sumikura
2 . 発表標題 Investigation of nitrogen-containing DLC thin films for biological response by neutron reflectometry
3 . 学会等名 ICDCM 2019 (30th International Conference on Diamond and Carbon Material) (国際学会)
4 . 発表年 2019年

1 . 発表者名 鬼頭大海, 大越康晴, 福原武志, 平塚傑工, Sarayut Tunmee, Ukit Rittihong, Chanan Euaruksakul, Hideki Nakajima, 中森秀樹, 矢口俊之, 本間章彦, 平栗健二
2 . 発表標題 各種DLCの光学定数とsp3/sp2構造の違いに依存した細胞接着特性の評価
3 . 学会等名 第33回ダイヤモンドシンポジウム
4 . 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Ohgoe, T. Fukuhara, N. Miyata, S. Tunmee, P. Kidkhunthod, T. Yaguchi, A. Homma, K. Hirakuri
2. 発表標題 Effects of foreign element contents on functional a-C:H film structure for biomedical applications
3. 学会等名 7th International Symposium on Surfaces and Interfaces for Biomaterials (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 多積直之, 大越康晴, 宮田登, 宮崎司, 矢口俊之, 本間彰彦
2. 発表標題 中性子反射率法による窒素含有DLC薄膜の構造評価
3. 学会等名 第66回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中里悠一郎, 本間章彦, 平栗健二, 矢口俊之, 大越康晴
2. 発表標題 NIH-3T3細胞の接着性および挙動に及ぼす窒素含有DLCの影響
3. 学会等名 第32回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 間山竜也, 宮田 登, 平塚傑工, 中森秀樹, 本間章彦, 平栗健二, 大越康晴
2. 発表標題 各種成膜方法により成膜したDLCの膜構造と表面特性との関連性の検討
3. 学会等名 第32回ダイヤモンドシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Nakazato, N. Miyata, T. Miyazaki, N. Tatsumi, T. Yaguchi, A. Homma, K. Hirakuri, Y. Ohgoe
2. 発表標題 Effect of nitrogen contained in a-C:H film deposition for cell behavior
3. 学会等名 ICDCM 2018 (29th International Conference on Diamond and Carbon Material) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 非結晶炭素膜の細胞凝集機能を判定する検査方法。	発明者 大越康晴, 鬼頭大海, 中森秀樹, 平塚傑工, 福原武志	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-188369	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	本間 章彦 (Homma Akihiko) (20287428)	東京電機大学・理工学部・教授 (32657)	
研究分担者	福原 武志 (Fukuhara Takeshi) (20359673)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師 (32620)	
研究分担者	宮田 登 (Miyata Noboru) (40465985)	一般財団法人総合科学研究機構(総合科学研究センター(総合科学研究室)及び中性子科学センター(研究開発・中性子科学センター・副主任研究員) (82121)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	山家 智之 (Yambe Tomoyuki) (70241578)	東北大学・加齢医学研究所・教授 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	白石 泰之 (Shiraishi Yasuyuki) (00329137)	東北大学・加齢医学研究所・准教授 (11301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関