

東京電機大学

博 士 論 文

非晶質炭素コーティングの細胞接触型医療デバイス応用  
を目的とした光学的評価に関する研究

Study on optical characterization for application of  
the amorphous carbon coatings to medical devices in touch with cells

2 0 2 2 年 3 月

金杉 和弥

# 目次

1 章	序論	P1
	§1-1.はじめに	P1
	§1-2.DLC 膜	P2
	(1) DLC 膜の構造と分類	P2
	(2) DLC 成膜法	P4
	§1-3.産業界における DLC 応用の課題と国際標準化動向	P6
	(1) 産業界における DLC 応用の課題	P6
	(2) DLC 膜の国際標準化動向	P6
	§1-4.バイオメディカル分野における DLC コーティング	P9
	(1) 細胞接触型医療デバイスへの DLC 応用と課題	P9
	(2) DLC 膜に対する光学的評価	P10
	§1-5.本論文の目的と意義	P11
	§1-6.本論文の構成	P12
	参考文献	P13
2 章	DLC 膜の細胞増殖性と最表面組成、光学定数の関連性	P17
	§2-1.はじめに	P17
	§2-2.光学定数による DLC 膜の分類分け	P18
	(1) DLC サンプル	P18
	(2) SE 分析	P21
	§2-3.DLC 膜の光学定数と細胞増殖性の関係	P23
	(1) <i>in-vitro</i> 細胞培養試験	P23
	(2) DLC 膜の光学定数と細胞増殖性の関係	P24
	§2-4.DLC 最表面組成と細胞増殖性の関係	P26
	(1) XPS 分析	P26
	(2) DLC 最表面組成と細胞増殖性の関係	P28
	§2-5.DLC 最表面組成と消衰係数の関係	P31
	§2-6.本章のまとめ	P33
	参考文献	P34
3 章	プラズマ後処理を施した DLC 膜の細胞増殖性と最表面組成、光学定数の関連性	P36
	§3-1.はじめに	P36
	§3-2.プラズマ後処理による DLC 最表面制御と細胞増殖性	P38

(1) DLC 成膜条件およびプラズマ後処理条件	P38
(2) AFM 分析	P40
(3) XPS 分析	P42
(4) 濡れ性評価	P46
(5) <i>in-vitro</i> 細胞培養試験	P49
§3-3.プラズマ後処理が DLC 膜の光学定数に与える影響	P52
(1) DLC 成膜条件およびプラズマ後処理条件	P52
(2) 濡れ性評価	P53
(3) SE 分析	P53
§3-4.本章のまとめ	P57
参考文献	P58

4 章	繊維状素材に成膜した DLC 膜の細胞増殖性と最表面組成、 光学定数の関連性	P60
§4-1.	はじめに	P60
§4-2.	ePTFE 人工血管への DLC 成膜	P61
(1)	DLC 成膜条件	P61
(2)	SEM 観察	P62
(3)	XPS 分析	P63
(4)	濡れ性評価	P65
(5)	<i>in-vitro</i> 細胞培養試験	P66
§4-3.	ePTFE 人工血管に成膜した DLC 膜の光学定数	P69
(1)	DLC 成膜条件	P69
(2)	SE 分析	P69
§4-4.	本章のまとめ	P73
	参考文献	P74
5 章	総論	P76
	謝辞	P80

# 1 章 序論

## §1-1.はじめに

近年、スマートフォンをはじめとする携帯端末、ソーシャルメディア、クラウドなどの情報通信技術（Information and Communication Technology : ICT）の目覚ましい技術革新に伴い、世界中で ICT の普及が進んでいる<sup>[1]</sup>。また、限りある資源の枯渇問題や地球環境問題への危機感が年々高まっており、持続可能な社会構造構築に向けた取り組みも加速している<sup>[2]</sup>。更に、世界規模で爆発的に感染拡大が進行している COVID-19 の問題により、我々の生活様式は大きな変貌を遂げようとしている<sup>[3]</sup>。

産業界では、これら社会構造の変化に伴う種々の顧客ニーズを満足するために、日々、新製品の開発を行っており、その実現には高機能かつ高性能な新素材の創生が必要不可欠とされている<sup>[4-5]</sup>。金属や高分子などを要素とする新素材の開発では、材料自身の分子構造や添加剤設計に加え、表面微細形状付与や、薄膜コーティング、表面改質などの高次加工も広く検討されている。この高次加工により、通常の単一材料では達成できない優れた性能発現が期待できる<sup>[6-7]</sup>。

中でも、本研究で対象としている炭素系ドライコーティング材料の 1 つであるダイヤモンド状炭素（Diamond-Like Carbon : DLC）膜は、1970 年代の初めに S.Aisenberg らがイオンビーム法により合成して以来、古くから自動車分野を中心に産業界で活用されている<sup>[8-9]</sup>。また、近年では、成膜技術と分析技術の日進月歩により、DLC の更なる高性能化や新たな付加価値が見出されており、それに付随して DLC 受託成膜市場も年々拡大することが見込まれている<sup>[10-11]</sup>。つまり、DLC コーティングは、産業界において欠かすことのできない高次加工手段の 1 つになっている。

## §1-2.DLC 膜

### (1) DLC 膜の構造と分類

DLC は、ダイヤモンドに由来する  $sp^3$  混成軌道結合とグラファイトに由来する  $sp^2$  混成軌道結合、水素 (H) 結合を含む長距離秩序を持たない非晶質構造と定義されている。図 1-1 に DLC、ダイヤモンド、グラファイトの基本構造を示す<sup>[12-15]</sup>。この構造を見ても分かるように、DLC は炭素を主成分としているため、資源が豊富であること、生態系に対して無害であることなど、環境調和性の高い魅力的な材料である。

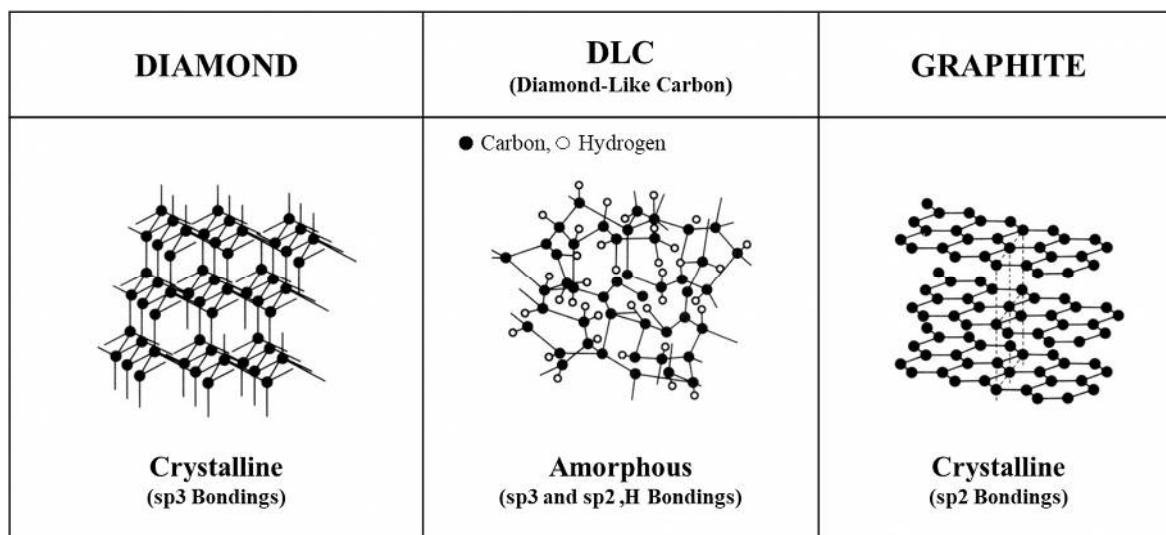


図 1-1 炭素材料の構造比較<sup>[15]</sup>

DLC の物性は、ダイヤモンドとグラファイトとの中間的な性質を持っており、膜中の  $sp^3$  混成軌道結合と  $sp^2$  混成軌道結合の結合比率、および水素含有量の構造制御により大きく変化する。つまり、DLC は非晶質炭素の総称であり、膜構造や膜物性の異なる様々な DLC が存在する。これにより、ダイヤモンドに匹敵する高い膜硬度や低摩擦係数、耐摩耗性、化学的不活性、ガスバリア性、生体適合性などの様々な特性を自在に、複合的に獲得することができる<sup>[12]</sup>。N.Ohtake らは DLC コーティングによるライフサイクルアセスメント分析を行い、超硬切削工具や自動車部品の長寿命化、燃費向上による  $CO_2$  削減効果を報告しており、

環境保護の観点からも DLC が有益であることを示唆している<sup>[16]</sup>。近年では DLC の定義を超えて、水素を含まない水素フリーDLC や、シリコン (Si)、フッ素 (F) などの各種不純物を添加した不純物含有 DLC も誕生しており、DLC 受託成膜メーカー毎の様々な商標で産業界でも認知されつつある<sup>[17-19]</sup>。

非晶質炭素の総称である DLC を膜構造に応じて細分化する取り組みも古くから検討されており、様々な構造モデルが提唱されている<sup>[20-23]</sup>。中でも W.Jacob らが提唱した構造モデルの発展系である、A.C.Ferrari と J.Robertson の  $sp^3$ - $sp^2$ -H<sub>2</sub> の三元状態図が最も有名である<sup>[13,24]</sup>。三元状態図を図 1-2 に示す。この図では、DLC の構造を  $sp^3$  混成軌道結合の成分量、 $sp^2$  混成軌道結合の成分量および水素含有量の関係に基づいて、水素化四面体非晶質炭素 (Hydrogenated tetrahedral amorphous carbon : ta-C:H)、四面体非晶質炭素 (Tetrahedral amorphous carbon : ta-C)、水素化非晶質炭素 (Hydrogenated amorphous carbon : a-C:H)、スパッタ非晶質炭素 (Sputtered amorphous carbon : sputtered a-C) の 4 種類を領域分けしている。それら DLC を比較的簡単に整理しているが、各 DLC の境界領域を厳密に切り分けることは難しいとされている。表 1-1 に DLC を含む炭素系材料の主な特性の比較を示す<sup>[23]</sup>。

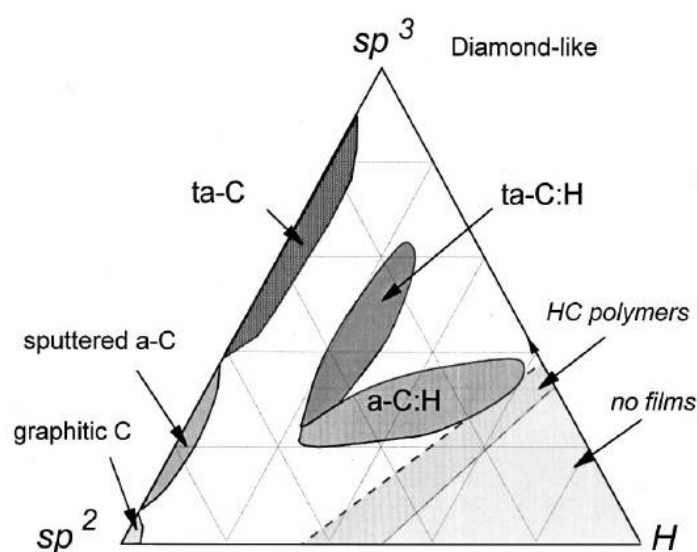


図 1-2 DLC の  $sp^3$ - $sp^2$ -H<sub>2</sub> の三元状態図<sup>[13]</sup>

表 1-1 DLC 膜を含む炭素系材料の主な特性の比較<sup>[23]</sup>

	sp <sup>3</sup> (%)	H(%)	Density(g cm <sup>-3</sup> )	Gap(eV)	Hardness(GPa)
Diamond	100	0	3.515	55	100
Graphite	0	0	2.267	0	—
C <sub>60</sub>	0	0	—	1.6	—
Glassy C	0	0	1.3-1.55	0.01	3
Evaporated C	0	0	1.9	0.4-0.7	3
Sputtered C	5	0	2.2	0.5	—
ta-C	80-88	0	3.1	2.5	80
a-C:H hard	40	30-40	1.6-2.2	1.1-1.7	10-20
a-C:H soft	60	40-50	1.2-1.6	1.7-4	<10
ta-C:H	70	30	2.4	2.0-2.5	50
Polyethylene	100	67	0.92	6	0.01

## (2) DLC 成膜法

DLC 膜の成膜法は、使用する炭素原料で区別する考え方もあるが、一般的には化学的気相成長法(Chemical vapor deposition : CVD)と物理的気相成長法(Physical vapor deposition : PVD)で大別される。DLC 成膜法の一例を図 1-3 に示す<sup>[25]</sup>。

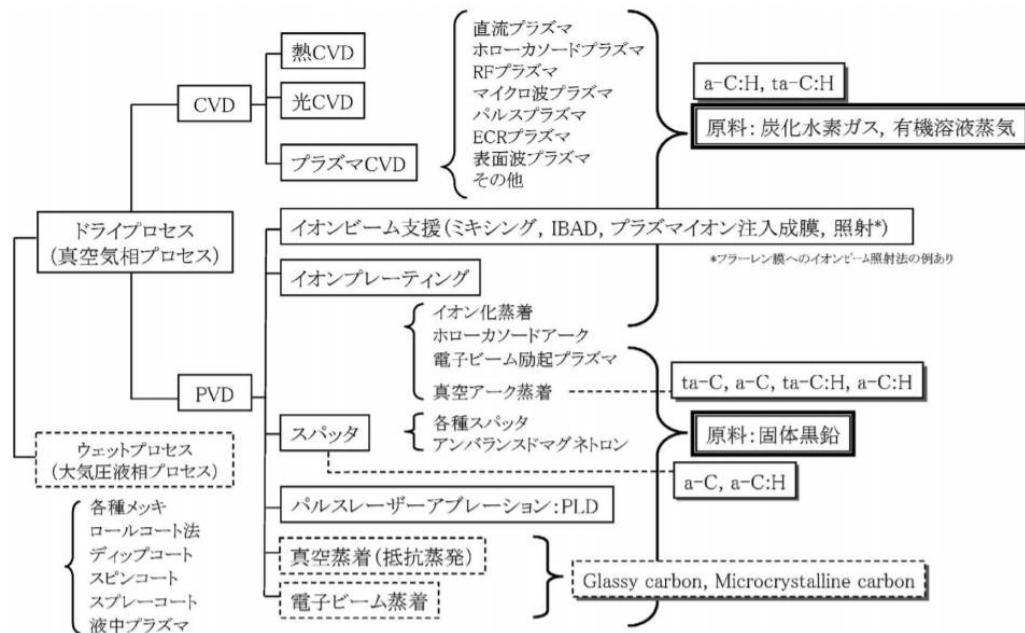


図 1-3 代表的な DLC 成膜法<sup>[25]</sup>

CVD 法と PVD 法による DLC 成膜の概略を以下に述べる。

CVD 法は、メタン( $\text{CH}_4$ )やアセチレン( $\text{C}_2\text{H}_2$ )などの炭化水素ガスを原料とし、そのガス原料をプラズマ分解する。そして、分解生成物である活性種やイオンを基板上に誘引し、化学反応させることで薄膜成長させる。例として、プラズマ励起周波数を任意制御した種々のプラズマ CVD 法などが挙げられる。これら CVD 法では、原料ガスの種類や基板に流入するイオンエネルギー、基板温度などに応じて膜構造を容易に制御できる<sup>[12]</sup>。なお、成膜環境は真空環境が一般的ではあるが、近年、大気圧環境下での DLC 成膜も報告されている<sup>[26]</sup>。また、PVD 法に比べて低温成膜となるため、融点の低い高分子材料にも適用検討されている。

一方、PVD 法は、固体炭素原料(黒鉛)を用いて、この固体原料を熱やプラズマ中のイオンなどで蒸発、スパッタし、飛来した炭素原子を基板に付着させて薄膜成長させる。代表的な PVD 法として、スパッタリング法やアーク蒸着法などが挙げられる。PVD 法では、固体原料から飛来した炭素原子の運動エネルギーを利用して DLC を堆積させるため、基板までの炭素原子の衝突回数（エネルギー損失）を減らすよう真空環境下で行われる<sup>[27]</sup>。それ故、PVD 法では、成膜環境の真空度やイオンエネルギーなどが DLC 構造に強く依存する。また、原料に水素が含まれないため、水素フリーの DLC が成膜できる。更に、固体原料に Si やチタン (Ti)、銅 (Cu) などの不純物を含有させることで容易に不純物添加 DLC が成膜できる。

以上のように、DLC 成膜法は CVD 法や PVD 法の中でも数多く存在し、それら成膜方式や成膜条件を変更することにより、DLC 膜構造が大きく変化する。言い換えると、DLC 成膜法の進化によって、多種多様の DLC が誕生したとも言える。



## §1-3.産業界における DLC 応用の課題と国際標準化動向

### (1) 産業界における DLC 応用の課題

前述したように、DLC は非晶質炭素の総称である。また、DLC 成膜方式や成膜条件を変更することにより、DLC の構造を容易かつ広範に制御できる。しかしながら、産業界の一般ユーザーにとっては、DLC の高い膜質制御性は魅力である一方で、複雑である。それ故、DLC の構造を正しく理解し、特定用途に適した DLC をユーザー自身で見出すことは難しく、時間とコストを掛けて受託成膜メーカーと共同でトライ＆エラーで条件探索を行う必要がある。これは製品サイクルの短縮化、研究開発費のミニマム化が求められている一般ユーザーにとっては大きな問題である。

### (2) DLC 膜の国際標準化動向

近年、産業界の一般ユーザーが特定用途に適した DLC を容易に選択できるよう、経済産業省（経産省）の「DLC 膜の国際標準化に関わる事業」を(株)野村総合研究所（野村総研）からの委託の形で、Japan New Diamond Forum (JNDF)と DLC 工業会が連携して推進している<sup>[28-29]</sup>。この標準化では、実用面を考慮し、比較的簡易な光学的評価手段に基づいて DLC を分類分けするアドバンス規格が検討されている。

DLC 膜の国際標準化に関わる事業の課題は下記 3 点である<sup>[28]</sup>。

- ① DLC の簡便な光学特性評価法の開発および ISO 規格案の作成、提案
- ② DLC の密着性試験に関する ISO 規格の提案
- ③ アモルファスカーボン膜の生体適合性評価法に関わる必要データの蓄積、およびそれらを基にした ISO 規格原案の作成

M.Hiratsuka らは、光学的評価手段の 1 つである分光エリプソメトリー分析 (Spectroscopic ellipsometry : SE)を活用し、DLC 膜の光学定数である屈折率

(Refractive index :  $n$ ) と消衰係数 (Extinction coefficient :  $k$ ) を測定すること

で、種々の DLC に分類できることを報告している<sup>[21,30]</sup>。また、異なる成膜法で作製した 50 種類の DLC サンプルの光学定数 ( $\lambda=550\text{nm}$ ) と膜硬度の関係を評価し、DLC 膜の屈折率と膜硬度に関連性があることも言及している (図 1-4)。そして、この屈折率が、DLC 膜の C-C  $\text{sp}^3$  結合構造と膜密度に相関があり、 $\text{sp}^3$  混成軌道結合の増加に伴って屈折率が大きくなることを述べている。一方、DLC 膜の消衰係数は、グラファイト構造に起因する  $\text{sp}^2$  混成軌道結合の増加に伴って大きくなることを言及している。つまり、DLC 膜構造と光学定数、膜硬度は密接な関係にあり、相関関係にあるのは妥当としている<sup>[30]</sup>。

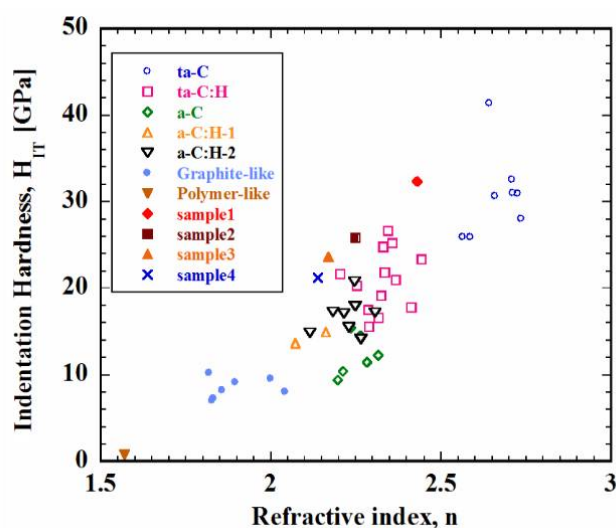


図 1-4 DLC 膜の屈折率と膜硬度の関係<sup>[30]</sup>

(Sample1-4 はイオン化蒸着法で作製された DLC 膜)

現在、光学定数に基づく DLC 膜の光学分類方法に関して ISO 規格案が提出されている。この光学分類方法は n-k 分類法 (n-k 法) と呼ばれており、ラウンドロビン試験用の手順書として TC107 (金属及び無機質皮膜) の枠組みで正式に各機関に配布 (ISO/TC N1687) されている。現状規定されている DLC 膜の光学的分類を図 1-5、表 1-2 に示す。この規格案は ta-C:H の範囲が狭く、そこに当てはまる DLC 膜を得ることは容易ではないと言われており、今後見直しが行われる予定である<sup>[21]</sup>。

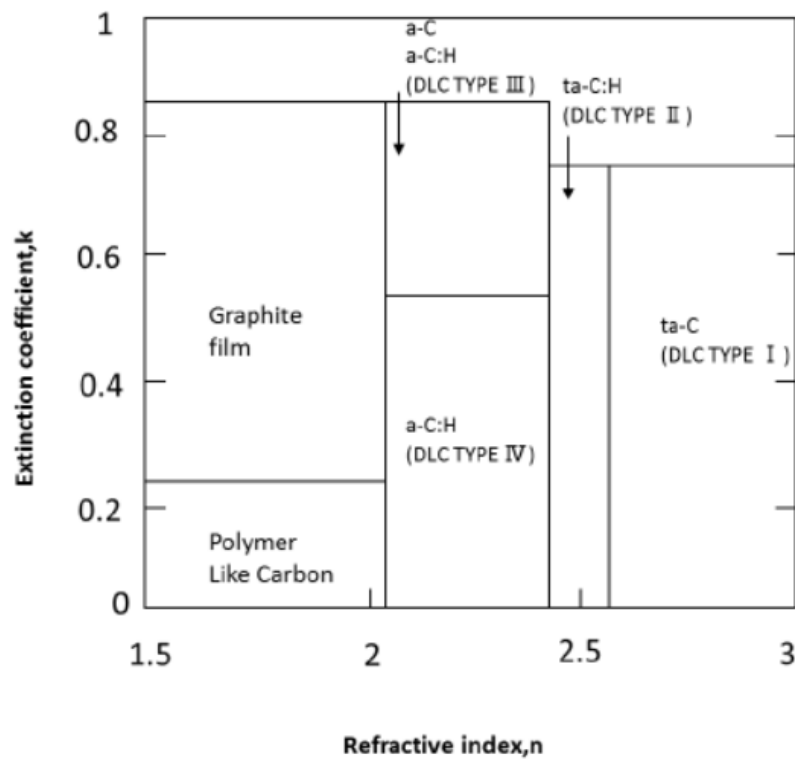


図 1-5 DLC 膜の光学的分類<sup>[21]</sup>

表 1-2 DLC 膜の光学的分類<sup>[21]</sup>

Name of DLC	Classification (tentative)	Refractive index, n ( $\pm 0.05$ )	Extinction coefficient, k
DLC TYPE I	ta-C	From 2.55 to 3.00	From 0 to 0.7
DLC TYPE II	ta-C:H	From 2.45 to 2.55	From 0 to 0.7
DLC TYPE III	a-C	From 2.10 to 2.45	From 0.5 to 0.85
DLC TYPE III	a-C:H	From 2.10 to 2.45	From 0.5 to 0.85
DLC TYPE IV	a-C:H	From 2.10 to 2.40	From 0 to 0.7
-	Polymer Like Carbon	From 1.50 to 2.10	From 0 to 0.25
-	Graphite film	From 1.80 to 2.10	From 0.25 to 0.85

## §1-4. バイオメディカル分野における DLC コーティング

### (1) 細胞接触型医療デバイスへの DLC 応用と課題

医療分野においても再生医療を中心に飛躍的な技術革新が進んでいる。一方で、日本は超高齢化を迎えようとしている。この高齢社会では、加齢に伴う臓器不全や運動器の機能障害等による患者数増加が懸念されており、ドナー数に関わらず、大量供給可能な細胞接触型医療デバイス（人工臓器、人工関節、人工骨等）の適用機会が増えるものと考えられる<sup>[31-32]</sup>。これら医療デバイスには、目的に応じて様々な生体材料が用いられているが、単一素材で全ての要求機能を満足することは難しく、古くから医療特性向上を目的にドライコーティング等の高次加工が検討されている<sup>[33]</sup>。また、携帯型のヘルスケア機器や診断機器、治療機器を用いたパーソナル医療や、病気が発症する前に事前になんらかの手段を用いて病状を予測する先制医療においても、デバイスと生体内物質の接触機会が増えると考えられており、より安全で安心な生体親和性インターフェースの構築が必須となる<sup>[34]</sup>。

DLC は生体内留置下でも長期間の安定性が見込まれ、優れた生体適合性（抗血栓性、細胞親和性）や抗菌性、機械特性などの医療特性を有することがこれまでに見出されている<sup>[35-38]</sup>。それ故、人工血管や人工関節、歯科インプラントへの応用も進められており、一部実用化されている<sup>[39-41]</sup>。今後、医療現場において DLC コーティングの臨床実績が蓄積され、その有用性や安全性が更に明確になることで、細胞接触型医療デバイスに対する DLC コーティングの需要が更に拡大していくものと予想される。

一方、前述したように、DLC の標準化事業において、「DLC 膜の生体適合性評価法に関わる必要データの蓄積、およびそれらを基にした ISO 規格原案の作成」が課題の 1 つに挙げられている。過去の知見は、各々の機関において、異なる成膜法で作製した単一の DLC タイプを評価した諸特性であり、種々の DLC に対して比較検討した事例は少ない。つまり、ISO 規格原案の作成には圧

倒的に情報が不足している。そのため、細胞接触型医療デバイスの細胞増殖性向上を目的に DLC コーティングを検討する場合、数日間の細胞培養試験の繰り返しは現状必須であり、特定用途に適した DLC 膜を得るまでに多大な労力と時間が掛かることが課題となる。今後、一般ユーザーがバイオインターフェースとしての DLC を容易に選択できるよう、バイオメディカル分野においても光学的評価法に基づく DLC 標準化が必須である。

## (2) DLC 膜に対する光学的評価

これまでに数多くの分析手段を用いて DLC 膜の特徴付けが行われている。中でもラマン分光分析や赤外吸収分析、X 線反射率分析、X 線光電子分光分析等の光学的評価法は、非破壊で DLC 膜中の  $sp^2/sp^3$  混成軌道結合状態や膜密度、表面組成を把握するための有効な手段として広く用いられている<sup>[42-45]</sup>。また近年では、放射光施設を利用した吸収端近傍 X 線吸収微細構造分析において、従来法よりも高精度に DLC 膜中の  $sp^3/(sp^2+sp^3)$  結合比率の決定が行われている<sup>[45-46]</sup>。これら光学的評価法は、研究開発段階では有用ではあるものの、比較的測定時間が掛かることから、より簡便な光学的評価法として非破壊かつ瞬時測定可能な分光エリプソメトリー分析が DLC 標準化事業で注目されている<sup>[47]</sup>。

一方で、バイオメディカル分野では、細胞や血液等の生体内物質が接触する DLC 膜の最表面の状態が特に重要とされている<sup>[48]</sup>。しかし、分光エリプソメトリー分析で得られる光学定数は膜全体の平均値となっており、最表面の情報を得ることは出来ない<sup>[49]</sup>。そのため、バイオメディカル分野において DLC を標準化する際には、光学定数だけでなく、DLC の最表面情報も考慮して細胞増殖性の関連指標を検討する必要がある。

## §1-5.本論文の目的と意義

前述したように、細胞接触型医療デバイスに対する表面改質手段として、DLC コーティングを更に応用展開していくためには、バイオメディカル分野においても光学的評価法に基づく DLC 膜の標準化が必須である。

本研究では、細胞接触型医療デバイスの細胞増殖性向上を目指した DLC コーティングの光学的評価標準導出に向けて、DLC 標準化事業で注目されている分光エリプソメトリー分析（光学定数）と比較的汎用的な最表面分析手段である X 線光電子分光分析（最表面組成）に着目し、下記 2 点の実現を目的とする。

- ① 種々の DLC 膜の光学定数と最表面状態、細胞増殖性の相互関係明確化
- ② 細胞増殖性に対する DLC の光学的評価指標の導出

なお、本研究における細胞種は、生体組織に数多く存在し、細胞培養の基礎研究で広く用いられている代表的なモデル細胞の 1 つであるマウス由来繊維芽細胞（NIH-3T3）を選定した。

本研究の成果は、経産省の委託を受けて推進している DLC 標準化事業において、その課題の 1 つに挙げられている「DLC 膜の生体適合性評価法の ISO 規格原案作成」に貢献できるものと考えられる。

また、DLC 膜の光学定数と最表面状態、細胞増殖性の相互関係を解明することは、医工学分野における学術的な観点で極めて価値があるものと考えられる。特に、DLC 膜構造に依存する光学定数と最表面状態の相互関係が解明できれば、バイオメディカル分野のみならず、最表面が関与する様々な工学分野において、DLC 最表面設計指標として光学定数が活用できる可能性がある。

更に、産業界における一般ユーザーが、ミスマッチすること無く、正しい理解の下、ユーザー自身でバイオインターフェースとしての DLC タイプを容易に選択、検査できるようになることは大変有意義であり、細胞接触型医療デバイスに対する DLC 膜の利用が飛躍的に高まるものと予想される。そして、DLC が持つ優れた諸特性により、新たな技術革新に繋がるものと考えられる。

## §1-6. 本論文の構成

本論文は以下の5章から構成されている。第1章は序論であり、本研究で扱う DLC について言及し、あわせて本論文の背景および目的、意義を述べ、構成を説明している。

第2章では、本論文の核となる基礎研究として、異なる成膜法で作製した DLC 膜を対象に、その光学定数、NIH-3T3 細胞増殖性、最表面組成の関係明確化に向けた取り組みを行っている。そして、その結果に基づいて、NIH-3T3 細胞増殖性に関連する DLC 膜の光学的評価指標について言及している。

第3章と第4章は、応用研究となっており、第2章で導出した光学的評価指標の適用範囲を見極めるために、表面後処理と下地構造の影響について調査している。第3章では、DLC の高機能化及び滅菌手段として広く使用されているプラズマ後処理に着目し、人工心臓用血液ポンプ上に成膜した DLC 膜を対象に、第2章で得られた光学的評価指標に基づくプラズマ後処理効果を検証すると共に、その光学定数と最表面特性、NIH-3T3 細胞増殖性の関係性について言及している。

第4章では、ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 人工血管に着目し、その内壁に成膜した DLC 膜を対象に、繊維状構造物に対する DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖促進効果を検証すると共に、その NIH-3T3 細胞増殖性と最表面特性、光学定数の関係性について言及している。

第5章は結論であり、本研究で明らかにした点を総括している。

## 参考文献

- [1] 総務省、情報通信白書（平成 26 年版）
- [2] 日本の展望委員会、「持続可能な世界の構築のために」（平成 22 年）
- [3] 厚生労働省 HP「新型コロナウイルス感染所について」
- [4] 村田 朋美、「持続可能な社会構築に向けた材料科学の役割」、材料と環境、61,414-421（2021）
- [5] 宮下 哲、「科学技術イノベーションを先導するナノテクノロジー・材料技術のトレンドと将来展望」、JST 事業セミナー資料（2019）
- [6] 諸貫 信行、「微細・精密加工技術を利用した機能表面の創製」、精密工学会,Vol.78,No.10,2012
- [7] 石井 孝也 他、「薄膜コーティング技術と応用分野の将来展望」、日新電機技報、Vol.53(2008.3)
- [8] S. AISENBERG & R. CHABOT, 「Ion-Beam Deposition of Thin Films of Diamondlike Carbon」, J. Appl. Phys., 42, 7（1971）2953
- [9] 森口 秀樹 他、「DLC 製造プロセスの歴史とその応用」、SEI テクニカルレビュー第 188 号（2016）
- [10] 矢野経済研究所 HP「2020 年版 ドライコーティング市場の全貌と将来展望」
- [11] 加藤 孝久 他、「表面処理技術としての DLC 膜とその展望」、表面技術、Vol.65,No.12,2014
- [12] ニューダイヤモンドフォーラム HP「ダイヤモンドライクカーボン（DLC）とは」
- [13] A. C. Ferrari, J. Robertson, 「Interpretation of Raman spectra of disordered and amorphous carbon」, Phys. Rev.. B61,20 (2000) 14095.
- [14] 日本アイティイーエフ(株)HP「DLC の定義」
- [15] 鈴木 秀人、池永 勝 著、「事例で学ぶ DLC 成膜技術」、日刊工業新聞社（2003）



- [16] 辻岡 正憲、「環境に優しいハードコーティングの技術動向とその応用」、  
表面技術、Vol.63,No.3,2012
- [17] ナノテック(株)HP「ICF コーティング」
- [18] (株)プラズマイオンアシスト HP「i-DLC コーティング」
- [19] 日本アイティーエフ(株)HP「ジニアスコート」
- [20] 日刊工業新聞、「DLC 成膜技術と工業的応用」、2013.11.19
- [21] mst HP「第 29 回 ISO/YC107 会議におけるカーボン膜・DLC 膜の規格化と今後の展望」
- [22] W.Jacob et.al.,「On the structure of thin hydrocarbon films」, Appl. Phys. Lett. 63, 1771 (1993)
- [23] J.Robertson,「Diamond-like carbon」, Mat.Sci.Eng.Rep. 37,129 (2002)
- [24] 吉田 健太郎、「環境調和型潤滑剤を用いた DLC 膜の低摩擦発現機構の解明」  
(2014)
- [25] 滝川浩史、「フィルタードアーク蒸着によるスーパーダイヤモンドライクカーボン膜合成」 J. Vac. Soc. Jpn.Vol. 51, No. 1, 2008
- [26] 大竹 尚登 他、「ナノパルスプラズマ CVD 法による大気圧下での DLC 合成」、表面技術、Vol.60,No.6,2009
- [27] 伊藤 弘高、「スパッタリング法による DLC 薄膜の作製」 J. Plasma Fusion Res. Vol.92, No.6 (2016) 454-459
- [28] ニューダイヤモンドフォーラム HP、「受託事業」
- [29] DLC 工業会 HP、「DLC 膜の国際標準化受託事業」
- [30] M. Hiratsuka et.al.,「Correlation between Optical Properties and Hardness of Diamond-Like Carbon Films」, Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering, Vol. 7, No. 2, 2013, 187-198
- [31] 井街 宏、「近未来の人工臓器」、J. IEE Japan, Vol.119, No.11 (1999)
- [32] 京本 政之、「人工関節・骨」、人工臓器 44 巻 3 号(2015)

- [33] 遠藤 一彦 他、「生体材料の表面処理」、表面技術,Vol.49, No7(1998)
- [34] 太田 淳、「表面技術とバイオ医療応用デバイス」、表面技術、  
Vol.65,No.6,2014
- [35] 平栗 健二、「DLC 膜の生体材料としての応用」、TANSO,No.190 313-  
319(1999)
- [36] K.Hirakuri et.al.,「Antibacterial property of DLC film coated on textile  
material」,Diamond and Related Materials, Volume 19, Issues 7-9(2010)690-694
- [37] Y.Ohgoe et.al.,「Reduction effect of nickel ion release on a diamond-like carbon  
film coated onto an orthodontic archwire」,Thin Solid Films,Volume 497, Issues  
1-2, 21 February 2006, Pages 218-222
- [38] Y.Ohgoe et.al.,「Evaluation of sliding properties and durability of DLC coating  
for medical devices」,Diamond and Related Materials, Volume 96, (2019)97-103
- [39] 尾関 和秀 他、「人工関節用高分子材料への DLC 膜形成とその評価」,2005  
年度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集,
- [40] 尾関 和秀 他、「インプラント補綴としてのレジン歯の物性改善」、日口  
腔インプラント誌、第 26 巻 第 1 号 (2013)
- [41] ストローブ(株)HP「製品情報」
- [42] Namwoong Paik,「Raman and XPS studies of DLC films prepared by a magnetron  
sputter-type negative ion source」,Surface & Coatings Technology 200 (2005)  
2170-2174
- [43] Y. Ohgoe et.al.,「Uniform deposition of diamond-like carbon films on polymeric  
materials for biomedical applications」,Surface & Coatings Technology 184 (2004)  
263-269
- [44] C.K. Park et.al.,「XPS and XRR studies on microstructures and interfaces of  
DLC films deposited by FCVA method」,Thin Solid Films,420-421(2002) 235-240
- [45] Y. Ohgoe et al.,「Classification of DLC films in terms of biological response」,

Surface & Coatings Technology 207 (2012) 350-354

- [46] 神田 一浩、「放射光を用いた薄膜評価とダイヤモンドライクカーボン膜の国際標準化」、第 53 回真空に関する連合講演論文集（2013）
- [47] 平塚 傑工、「大電力パルススパッタリング法による DLC 成膜技術と光学的検査方法の研究」東京理科大学博士論文
- [48] 筏 義人、「人工臓器用材料に対する生体反応」、化学と生物, Vol.28, No8
- [49] 榎堀場製作所 HP「分光エリプソメトリーでわかること」

## 2 章 DLC 膜の細胞増殖性と 最表面組成、光学定数の関連性

### §2-1.はじめに

第1章で述べたように、産業界の一般ユーザーが特定用途に適したDLCを容易に選択できるよう、経産省の委託を野村総研から請け負う形で、JNDFとDLC工業会がDLCの標準化事業を進めており、その標準化事業の課題の1つにDLCの生体適合性評価法に関する内容も挙げられている<sup>[1-2]</sup>。中でも、DLC膜の細胞増殖性の把握には、専門的な細胞培養施設に加え、数日間の細胞培養試験が現状必須とされており、細胞接触型医療デバイスに対する表面改質手段としてDLCコーティングを応用拡大する上で、バイオメディカル分野においても光学的評価法に基づくDLC膜の標準化が必須である。

本章では、細胞接触型医療デバイスの細胞増殖性向上を目指した DLC コーティングの光学的評価指標導出に向けて、DLC 標準化事業で注目されている分光エリプソメトリー分析と比較的汎用的な最表面分析手段である X 線光電子分光分析に着目し、種々の DLC 膜の光学定数と最表面状態、NIH-3T3 細胞増殖性の相互関係明確化を図った。そして、そのメカニズムに基づいて NIH-3T3 細胞増殖性に対する DLC 光学的評価指標を検討した。具体的には、複数の PVD 法と CVD 法によって任意に作製された 9 種類の DLC サンプルに対し、光学定数、NIH-3T3 細胞増殖性、最表面組成の相互関係を確認した。そして、それらの関連性から、NIH-3T3 細胞増殖性に対する DLC 膜の光学的評価指標を導出した。

## §2-2.光学定数による DLC 膜の分類分け

### (1) DLC サンプル

本実験では、DLC 膜構造や水素含有量を広範に変化させるために、異なる PVD 法、CVD 法で作製した 9 種類の DLC サンプルを準備した。その 9 種類の DLC サンプルは、国内の主要 DLC 受託成膜メーカーのご協力の下、JNDF から提供された。なお、PVD 法には、高電力パルススパッタリング法(High Power Impulse Magnetron Sputtering : HiPIMS)、アンバランスドスパッタリング法(Unbalanced Magnetron Sputtering : UBMS)を用いた。第 1 章で述べたように、これらは黒鉛原料を用いており、水素元素を含まない DLC が成膜できる。一般的に UBMS 法に比べて HiPIMS 法の方が炭素原子のイオン化率が高く、 $sp^3$  混成軌道結合の成分が大きな DLC となる。一方、CVD 法には、直流パルスプラズマ CVD 法(DC pulsed plasma CVD : DC-PCVD)、高周波プラズマ CVD 法 (r.f. plasma CVD : RF-PCVD)を用いた。炭化水素ガスを原料としており、水素元素を含む DLC が成膜できる。いずれの DLC 成膜法も産業界において広く活用されている<sup>[3-5]</sup>。表 2-1 に各 DLC サンプルの成膜法を示す。

表 2-1 DLC サンプルの成膜法

Sample No.	Depoition methods
1,2,4	RF-PCVD
3	HiPIMS
5,6	DC-PCVD
7,8	UBMS
9	UBMS+ DC-PCVD

上記 DLC 成膜法において、医療用金属材料として汎用性の高いステンレス（SUS 316L）製の平面基板（10 mm×10 mm, t: 1 mm, Shimadzu Science East Co.）とディッシュ（φ 35 mm, t: 10 mm, Shimadzu Science East Co.）上に DLC を各々成膜した。なお、平面基板は光学定数および最表面分析用、ディッシュは細胞培養試験用である。図 2-1 にディッシュに成膜した DLC 写真を示す。図中の“Control”とは DLC 成膜を施していない未成膜のディッシュのことを指す。これらサンプルの着色状態からも DLC 膜構造、膜厚の違いが示唆される。

各 DLC 膜の表面粗さは、共焦点レーザー走査型顕微鏡（Lext OLS 4000, Olympus Corp. Tokyo, Japan）を用いて測定した。本顕微鏡の測定領域は  $259 \times 258 \mu\text{m}$ 、測定分解能は 1 nm である。結果として、本実験で準備した各 DLC サンプルの表面粗さは 65～75 nm の範囲であった。一方、Control の表面粗さは約 64 nm であり、母材の表面粗さの影響を強く受けていることが示唆される。本研究で用いる NIH-3T3 細胞のサイズは数十～数百ミクロンサイズであることから、各 DLC サンプル間の表面粗さ（数 nm 程度）の違いは細胞増殖性に影響を与えないものと考えられる。

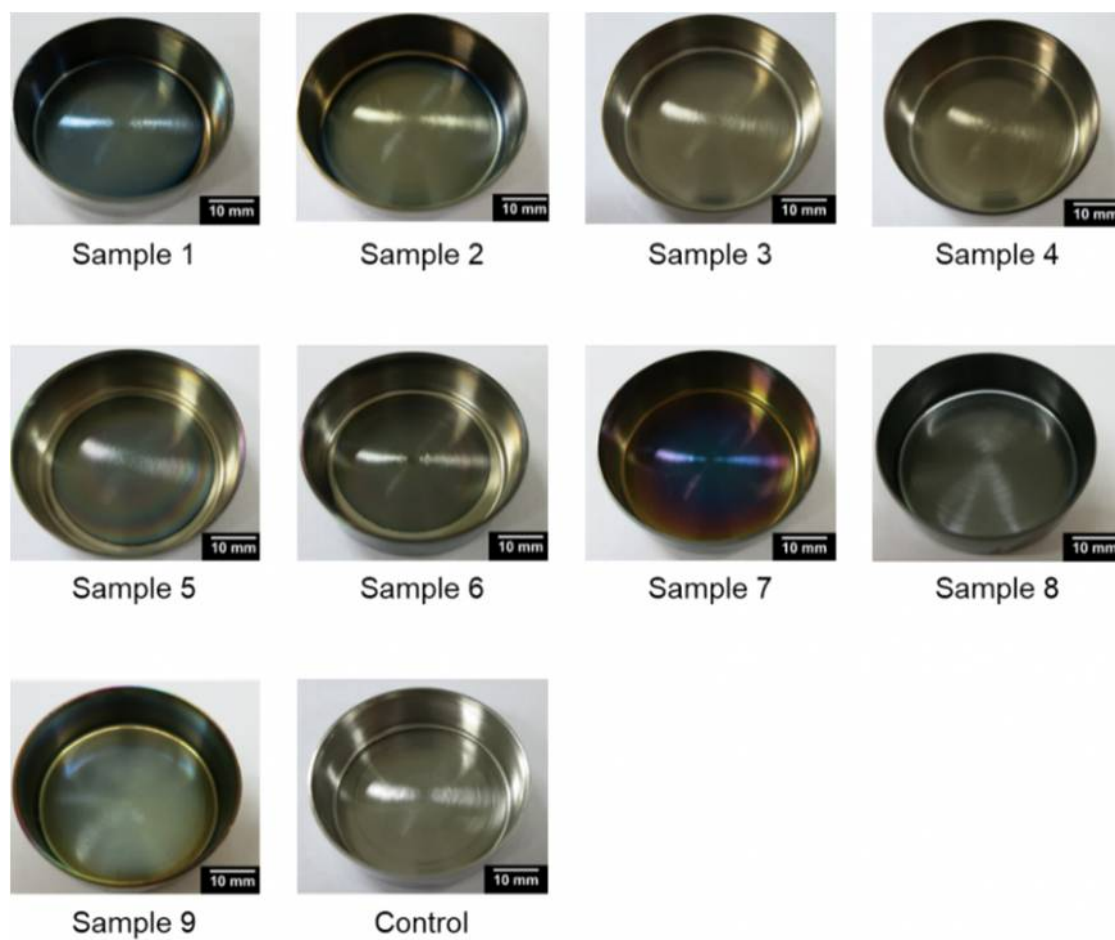


図 2-1 9 種類の DLC サンプル及び 316LSUS ディッシュ (Control)

## (2) SE 分析

第 1 章で示したように、n-k 法は、a-C、a-C:H、ta-C、ta-C:H、高分子状炭素 (polymer-like carbon : PLC)、グラファイト状炭素 (graphite-like carbon : GLC) の 6 タイプの DLC 膜に分類するための有効な手段として注目されている。また、M.Hiratsuka らは光学定数が DLC 膜中の水素含有量と  $sp^2$  クラスターの量と秩序に強く依存することを言及している<sup>[6-7]</sup>。つまり、n-k 法は DLC 構造モデルである 3 元状態図と密接な関係にあるものと考えられる。

本実験では、各 DLC サンプルの光学定数を得るために、分光エリプソメトリー分析(SE: UVISEL NIR 23301010I, HORIBA, Ltd., Japan)を行った。SE 分析は、表面感度が良く、非破壊、非接触な光学的評価法である。

本 SE 分析では、入射角を  $70^\circ$  に固定した SE 装置において、波長 191~2066 nm (光子エネルギー 0.6~6.5 eV) の s 偏光と p 偏光の反射振幅比角 ( $\psi$ ) と位相差 ( $\Delta$ ) を測定した。なお、スポットサイズは 1mm × 3mm の楕円形状とした。そして、 $\psi$  と  $\Delta$  の実測スペクトルを基に、平均二乗誤差 ( $\chi^2$ ) が小さくなるよう、DLC 膜層／中間膜／下地構造を想定した仮想の薄膜多層モデルによる回帰分析を実施した<sup>[6,8]</sup>。なお、DLC 膜層の解析モデルには Tauc-Lorentz 分散式を用いた。

SE 分析により同定した 9 種類の DLC サンプルの光学定数、膜厚、 $\chi^2$  を表 2-2 に示す。また、表面粗さ評価の結果も合わせて表 2-2 に示す。なお、光学定数は n-k 法で採用されている波長 550nm の値である。結果として、本 DLC サンプルの n は 1.88 - 2.28、k は 0.13 - 0.72 の範囲となった。そして、n-k 法に基づいて 4 タイプ (a-C、a-C:H、PLC、GLC) の DLC 膜に分類された。DLC 膜の中で GLC と a-C タイプは比較的  $sp^2$  含有量が多く、水素含有量は低くなることが知られている。一方、PLC または a-C:H タイプのように、比較的水素含有量が多いタイプは、 $sp^2$  サイトにおける多量の  $\pi$ - $\pi^*$  結合の減少を引き起こし、k が低くなると言われている<sup>[6,9]</sup>。



表 2-2 SE 分析および表面粗さ評価の結果

Type		$n$	$k$	Film thickness [nm]	$\chi^2$	Surface roughness [nm]
		$\lambda = 550$ [nm]				
DLC TYPE IV	a-C:H sample No. 1, 2, 6	2.20	0.31	77.5	0.63	$75 \pm 3$
		2.20	0.33	85.4	0.55	$71 \pm 1$
		2.12	0.25	192.6	10.0	$77 \pm 15$
DLC TYPE III	a-C sample No. 3, 4	2.28	0.72	15.6	0.18	$75 \pm 3$
		2.07	0.64	33.5	0.49	$73 \pm 1$
PLC	polymer-like sample No. 5, 7, 9	2.03	0.14	146.7	8.65	$68 \pm 11$
		1.88	0.13	250.0	2.54	$68 \pm 1$
		1.98	0.18	316.5	1.75	$65 \pm 4$
GLC	graphite-like sample No. 8	1.90	0.54	371.1	0.47	$76 \pm 4$
-	316L stainless steel Control	-	-	-	-	$64 \pm 3$

## §2-3.DLC 膜の光学定数と細胞増殖性の関係

### (1) *in-vitro* 細胞培養試験

n-k 法に基づいて 4 タイプ (a-C、a-C:H、PLC、GLC) に分類された各 DLC 膜の細胞増殖性を確認するために、生体外 (*in-vitro*) 試験による 72 時間の細胞培養試験を行った。なお、本評価ではステンレスディッシュ上に成膜された DLC サンプルを用いた。この *in-vitro* による細胞培養試験では、細胞種としてマウス由来の繊維芽細胞 (NIH-3T3) を用いた。NIH-3T3 は、生体内組織に数多く存在しており、対象サンプルの細胞親和性を評価する際の代表的な接着性のモデル細胞の 1 つとして頻繁に用いられている。

細胞培養条件を表 2-3 に示す。なお、細胞培養試験の前に、各 DLC サンプル表面に付着している汚染物をブローアで除去した。また、殺菌処理として、各 DLC サンプル表面に 253.7nm の紫外線を 1 時間照射した。

表 2-3 細胞培養条件

Cell	Mouse fibroblast (NIH-3T3)
Seeding density	$0.5 \times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup>
Medium	D-MEM/F-12 containing 5% fetal bovine serum
CO <sub>2</sub> concentration	5.0%
Temperature	37.0°C
Incubation time	72 h
pH	6.8–7.2

細胞培養試験の後、DLC 膜上に付着している細胞をトリプシン (Wako, 0.25w/v% Trypsin-1mmol/l EDTA・4Na Solution with Phenol Red) によって剥離した。そして、その剥離した生存細胞を、1.5 時間の間、37°C のインキュベーション下において CellTiter-Blue® Viability Assay (Promega, USA) を使って評価した。この評価では、生存細胞によってレゾルフィンに還元されるレサズリン染料を用い

ており、還元されたレゾルフィン量から生存細胞を推定している。そのレゾルフィン量は 570nm の吸光度測定から見積もった。吸光度測定では、測定検体(n=4~5)の平均値±標準偏差とした。また、各 DLC サンプルの平均値と control 間の統計学的な有意差を判断するために、t 検定 (Student's t-test) を実施した。なお、t 検定では、 $p < 0.05$ (5%未満)は有意差だと判断している。

## (2) DLC 膜の光学定数と細胞増殖性の関係

表 2-4 に各種 DLC 膜の光学定数と NIH-3T3 細胞増殖性の関係を示す。なお、DLC 膜の細胞増殖性は、control に対する比率で表している。その比率が “1” 付近 ( $0.05 < p$ )となる場合は control 同様の細胞増殖性であり、“1” ( $p < 0.05$ ) よりも高くなると、control よりも細胞増殖促進効果が高いことを意味する。

結果として、各 DLC サンプルの細胞増殖レベルは、control ( $0.05 < p$ ) 同等かそれ以上高い ( $p < 0.05$ ) 2 つのグループに分類されることを確認した。Control である 316L stainless steel は一般的な医療用金属材料であることから、いずれの DLC タイプも良好な細胞親和性を有していることが示唆される。

表 2-4 各種 DLC 膜の光学定数と NIH-3T3 細胞増殖性

type	$n$	$k$	NIH-3T3 proliferation rate	$p$ -value (Student's $t$ -test)
	$\lambda = 550$ [nm]		cell proliferation test	
a-C:H sample No. 1, 2, 6	2.20	0.31	$1.05 \pm 0.14$ (n: 4)	0.37
	2.20	0.33	$0.94 \pm 0.21$ (n: 4)	0.36
	2.12	0.25	$0.76 \pm 0.16$ (n: 5)	0.09
a-C sample No. 3, 4	2.28	0.72	$1.66 \pm 0.21$ (n: 4)	0.004 ( $p < 0.05$ )
	2.07	0.64	$1.39 \pm 0.26$ (n: 4)	0.03 ( $p < 0.05$ )
polymer-like sample No. 5, 7, 9	2.03	0.14	$0.88 \pm 0.23$ (n: 5)	0.26
	1.88	0.13	$0.98 \pm 0.20$ (n: 5)	0.46
	1.98	0.18	$1.22 \pm 0.20$ (n: 5)	0.10
graphite-like sample No. 8	1.90	0.54	$1.47 \pm 0.30$ (n: 5)	0.02 ( $p < 0.01$ )
316L stainless steel Control	-	-	1	-

図 2-2 に DLC 膜の  $n$ - $k$  プロットと細胞増殖性の関係を示す。なお、図中のバブルサイズは、DLC 膜の細胞増殖レベルの違いを示しており、バブルサイズが大きいものは細胞増殖レベルが高い。結果として、DLC 膜タイプの中で比較的消衰係数が高い GLC と a-C は、PLC や a-C:H よりも細胞増殖レベルが高いことが分かった。

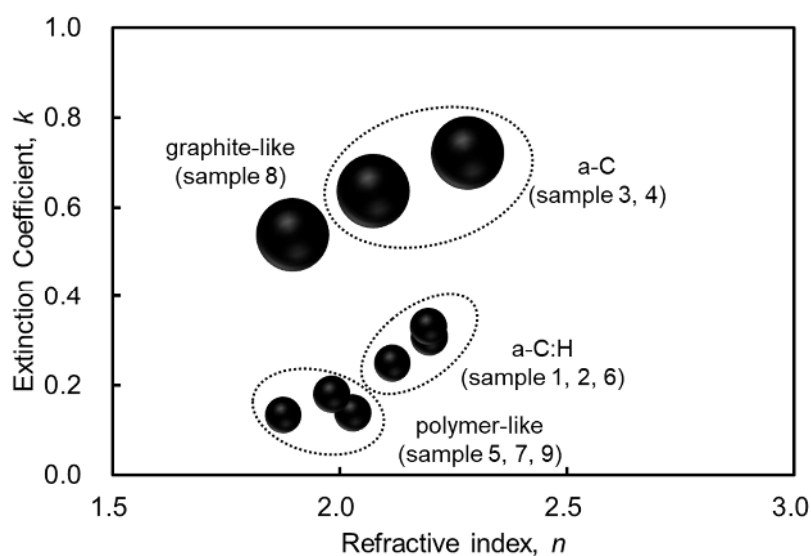


図 2-2 DLC 膜の  $n$ - $k$  プロットと NIH-3T3 細胞増殖性の関係

そこで、DLC 膜の光学定数の中で消衰係数に着目した。図 2-3 に DLC 膜の消衰係数と細胞増殖性の関係を示す。結果として、DLC 膜の細胞増殖性は、消衰係数に応じて 2 つの群に分類された。そして、 $t$  検定において、消衰係数の大きい群と小さい群の間で細胞増殖性に有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。

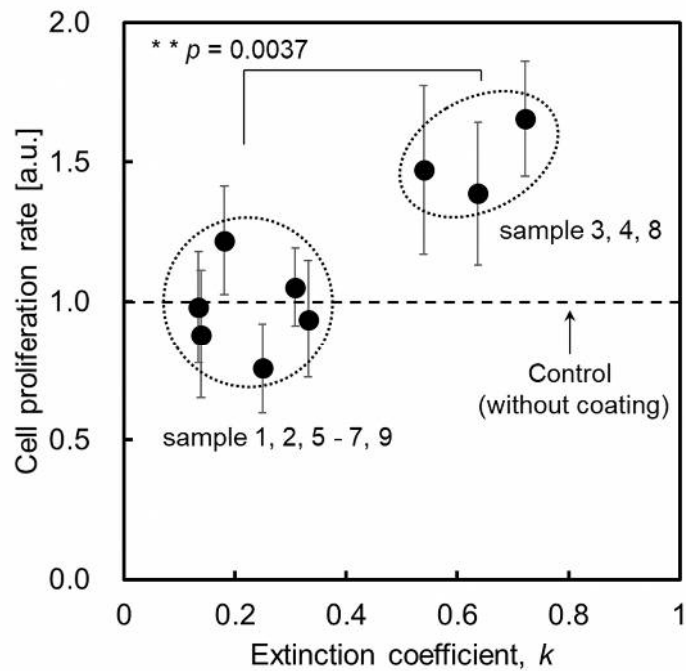


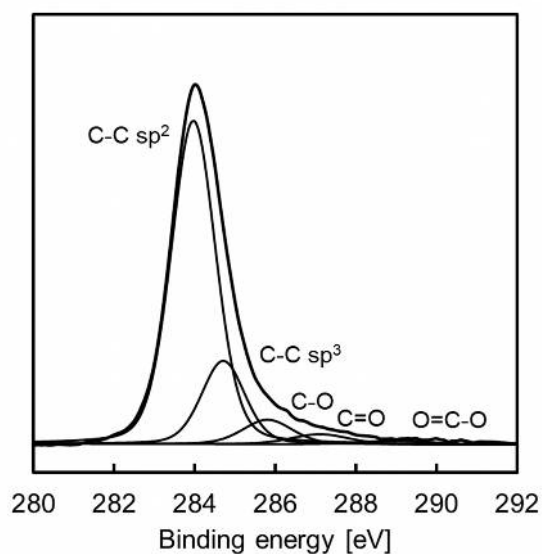
図 2-3 DLC 膜の消衰係数と NIH-3T3 細胞増殖性の関係

## § 2-4.DLC 最表面組成と細胞増殖性の関係

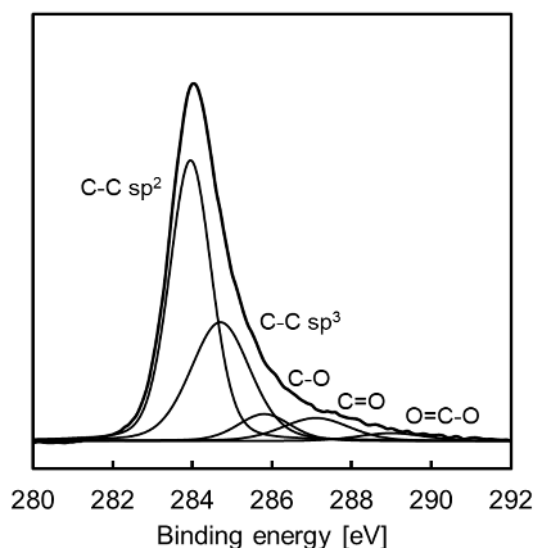
### (1)XPS 分析

次に、各種 DLC 膜の最表面組成を確認するために、X 線光電子分光分析(X-ray photoelectron spectroscopy : XPS,JPS-9000MC, JEOL Ltd., Japan)を行った。その XPS 分析では、非単色化放射線 (MgK $\alpha$  線源、10 mA、10 kV) を用い、Carbon 1s (C1s) スペクトルを測定した。そして、DLC 膜の構成成分である C-C sp<sup>2</sup>, C-C sp<sup>3</sup>, C-O, C=O, O=C-O の 5 つの結合状態を把握するために、C1s スペクトルをローレンツ成分 70%、ガウス成分 30%とする Voight 関数を用いて波形分離を行った。なお、各結合の結合エネルギー位置は、C1s の C-C sp<sup>2</sup> 結合ピーク(284.0eV 付近)を基準とした。また、C1s スペクトルは Shirley 関数を用いて事前にバックグラウンド補正を行った。C-O、C=O、O=C-O 結合は酸化反応の影響で、炭素の化学シフトが大きくなることが知られている。この DLC 最表面の酸素結合は DLC 成膜後の大気暴露によって生成されたものと考えられる。

特に、C=O および O=C-O 結合は、C1s スペクトル中の C-O 結合よりも化学シフトが大きくなる。これら C=O および O=C-O 結合はカルボキシル基に由来するものであり、DLC 膜の最表面に生成される<sup>[10-12]</sup>。一例として、図 2-4 (a)と (b)に、C-O、C=O、O=C-O のピーク強度に差のある 2 つの DLC 膜の C1s スペクトルを示す。本検討では、これら結合成分の差異を比較するために、C1s スペクトルに対する各結合成分（面積）比率を算出した。



(a) C-O、C=O、O=C-O の酸素結合強度が低い DLC 膜



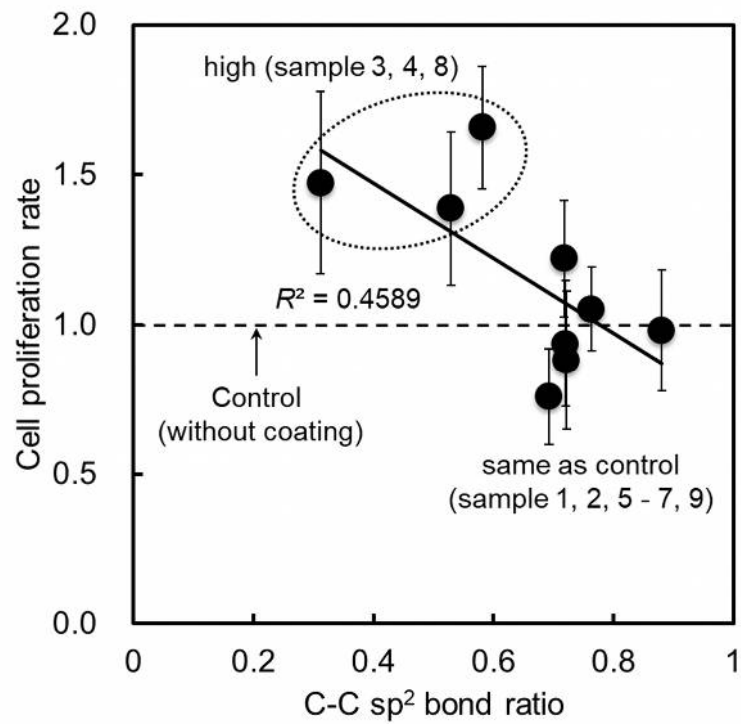
(b) C-O、C=O、O=C-O の酸素結合強度が高い DLC 膜

図 2-4 DLC 膜の C1s スペクトル

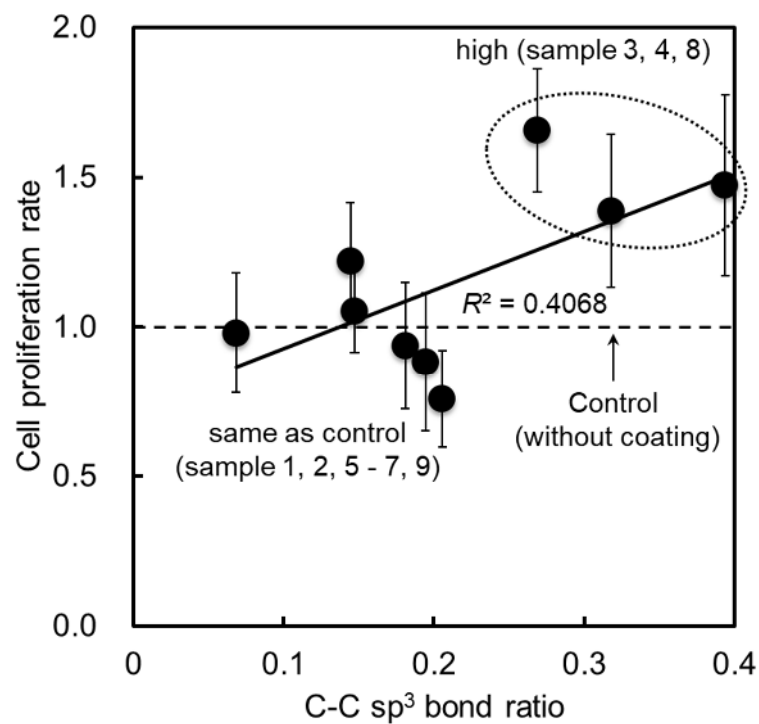
## (2) DLC 最表面組成と細胞増殖性の関係

各 DLC 膜の最表面組成（各結合成分比率）と細胞増殖性との関係を図 2-5 に示す。結果として、DLC 膜の C=O 結合比率は、C-C sp<sup>2</sup>、C-C sp<sup>3</sup>、C-O、O=C-O 結合比率よりも細胞増殖性との相関が高いことを確認した ( $R^2 = 0.55$ )。また、C=O 結合比率が 0.05 以下となる “same as control” 群の DLC サンプルは、細胞増殖性は Control と同程度であった。対照的に、“high” 群の DLC サンプルでは、細胞増殖が促進する傾向が見られた。

Caro らは、吸着計算の結果から、酸素の殆どがケトン型 (C=O) かエポキシド型 (C-O-C) の結合を形成する傾向があると述べている<sup>[13]</sup>。更に、ケトン類よりもエポキシド類の方が、出現頻度が理論上低いとしている<sup>[13]</sup>。つまり、DLC 最表面の C=O 結合比率の増加は酸素吸着による表面酸化の進行を反映しており、それに伴って DLC 表面の表面自由エネルギーが高くなっているものと考えられる<sup>[14]</sup>。<sup>15]</sup>。また、C=O および O=C-O 結合に由来するカルボキシル基によって負電位を帯びることから、DLC 表面電位も負極側に高くなっている可能性がある。つまり、DLC 膜の表面酸化に伴う電気化学的な特性が影響して細胞増殖を促進したものと考えられる。



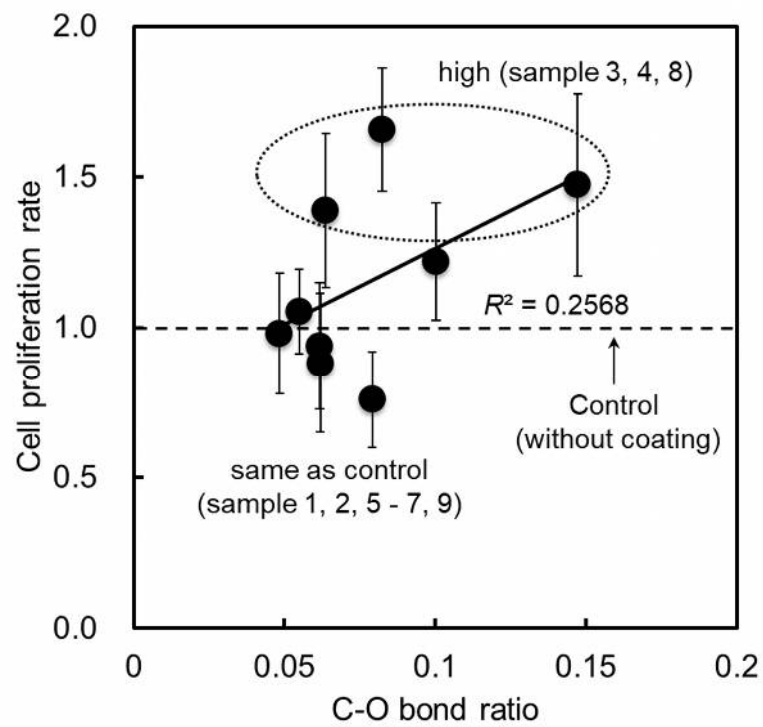
(a) C-C sp<sup>2</sup> 結合比率と細胞増殖性の関係



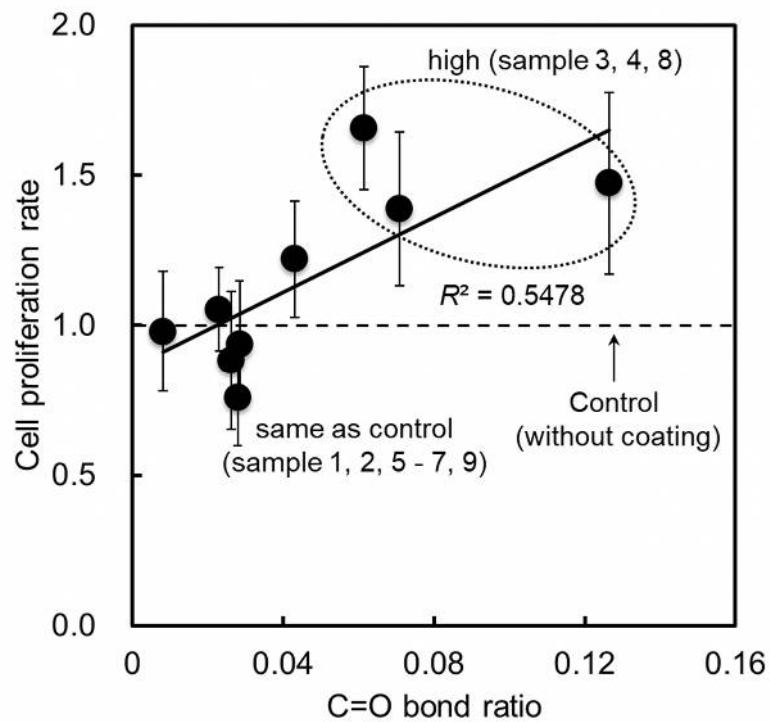
(b) C-C sp<sup>3</sup> 結合比率と細胞増殖性の関係

図 2-5 (a,b) DLC 膜の各結合成分比率と NIH-3T3 細胞増殖性の関係



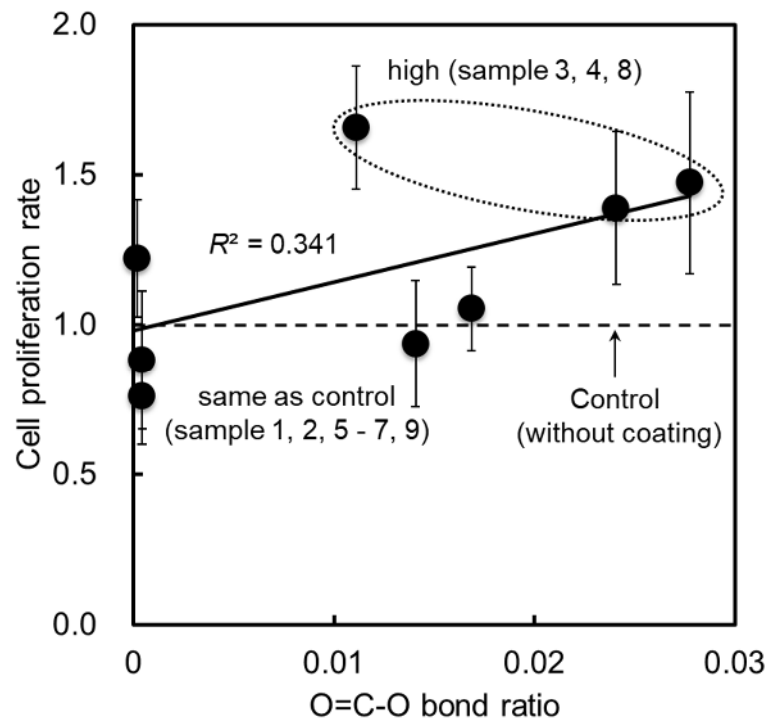


(c) C-O 結合比率と細胞増殖性の関係



(d) C=O 結合比率と細胞増殖性の関係

図 2-5 (c,d) DLC 膜の各結合成分比率と NIH-3T3 細胞増殖性の関係



(e) O=C-O 結合比率と細胞増殖性の関係

図 2-5 (e) DLC 膜の各結合成分比率と NIH-3T3 細胞増殖性の関係

## § 2-5.DLC 最表面組成と消衰係数の関係

上記より、DLC 膜の消衰係数と DLC 最表面の C=O 結合比率が高い DLC 膜タイプ (GLC、a-C) ほど、NIH-3T3 細胞増殖が促進されることが示された。そこで、DLC 膜の消衰係数と C=O 結合比率に着目し、それらの関連性を確認した。図 2-6 に DLC 膜の消衰係数と C=O 結合比率の関係を示す。結果として、図 2-3 と同様、9 種類の DLC サンプルは消衰係数に応じて C=O 結合比率が高い群と低い群の 2 つの群に分けられた。そして、t 検定において、それら 2 つの群の間で有意な差が認められた ( $p < 0.01$ )。

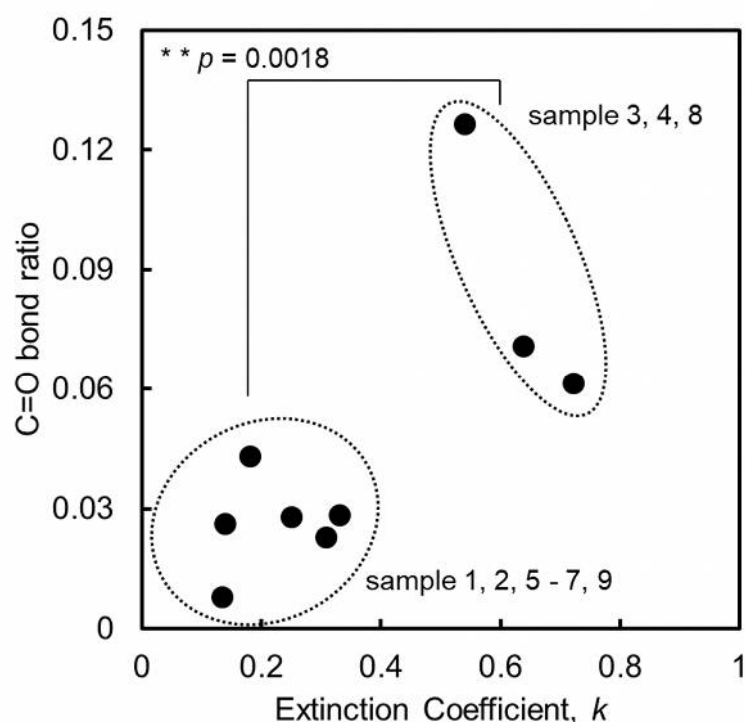


図 2-6 DLC 膜の消衰係数と C=O 結合比率の関係

第 1 章で記載したように、DLC 膜構造と光学定数は互いに密接な関係にあり、DLC 膜の消衰係数は、グラファイト構造に起因する  $sp^2$  混成軌道結合や水素含有量に強く依存する<sup>[6]</sup>。

一方、水素添加された非晶質炭素は、酸化反応性が低いことが知られている<sup>[16]</sup>。これは C-H 結合の方が C-C 結合よりも結合エネルギーが高いことや、水素終端によって反応性の高い非結合手量が減少するためと考えられる。また、 $\pi$  結合を有する C-C  $sp^2$  結合は  $\pi$  電子が広く散在しているため、C-C  $sp^3$  結合に比べて反応性が高いと言われている<sup>[16]</sup>。つまり、DLC 膜の表面酸化（特に C=O 結合）は、水素終端が無く、 $sp^2$  混成軌道結合比率が高くなる（ $\pi$  電子量が多くなる）ほど進行するものと考えられる。

以上の検討結果より、GLC や a-C などの水素含有量が低く、 $sp^2$  混成軌道結合比率が高い DLC 膜は、消衰係数が高く、C=O 結合比率が高くなる。一方、PLC や a-C:H などのように、水素含有量が高く  $sp^2$  混成軌道結合比率が低い DLC 膜

は、消衰係数が低く、C=O 結合比率が低くなる。つまり、少なくとも本研究で検証した 4 タイプの DLC 膜において、DLC 膜の消衰係数と C=O 結合比率、NIH-3T3 細胞増殖性が相互関係にあるのは妥当と考えられ、DLC 膜の消衰係数や C=O 結合比率を指標にすることで NIH-3T3 細胞増殖性のレベルを簡易的に工程検査できるものと考えられる。

## § 2-6.本章のまとめ

本章では、細胞接触型医療デバイスの細胞増殖性向上を目指した DLC コーティングの光学的評価指標導出に向けて、DLC 標準化事業で注目されている分光エリプソメトリー分析と比較的汎用的な最表面分析手段である X 線光電子分光分析に着目し、種々の DLC 膜の光学定数と最表面状態、NIH-3T3 細胞増殖性の関連性を確認した結果、以下の知見を得た。

- ① 光学定数に基づいて分類した 4 種類の DLC タイプ間の NIH-3T3 細胞増殖性を比較した結果、相対的に高い消衰係数を持つ a-C と GLC が、a-C:H や PLC に比べて高い細胞増殖促進性を示すことを見出した。
- ② そして、NIH-3T3 細胞増殖性と相関のある消衰係数に着目し、その消衰係数と DLC 最表面の各結合成分比率の関係性を確認した結果、DLC 最表面の C=O 結合比率と消衰係数の間に強い相関があることを明らかにした。
- ③ 上記 DLC 膜の光学定数と最表面状態、細胞増殖性の関係性に基づいて、DLC 最表面の C=O 結合比率、又は、消衰係数が NIH-3T3 細胞増殖性の光学的評価指標として有用になることを示唆した。

## 参考文献

- [1] ニューダイヤモンドフォーラム HP、「受託事業」
- [2] DLC 工業会 HP、「DLC 膜の国際標準化受託事業」
- [3] 滝川浩史、「フィルタードアーク蒸着によるスーパーダイヤモンドライクカーボン膜合成」 J. Vac. Soc. Jpn. Vol. 51, No. 1, 2008
- [4] 森口 秀樹 他、「DLC 製造プロセスの歴史とその応用」、SEI テクニカルレビュー 第 188 号 (2016)
- [5] 黒岩 雅英 他、「医療用ダイヤモンド状炭素 (DLC) 成膜に最適な大電力パルスマグネトロンスパッタ (HiPIMS) 用パルス電源の開発」、J. Vac. Soc. Jpn, Vol. 60, No. 9, 2017
- [6] M. Hiratsuka et.al., 「Correlation between Optical Properties and Hardness of Diamond-Like Carbon Films」, Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering, Vol. 7, No. 2, 2013, 187-198
- [7] mst HP 「第 29 回 ISO/YC107 会議におけるカーボン膜・DLC 膜の規格化と今後の展望」
- [8] 田所 利康、「分光エリプソメトリー: 基礎から応用まで」、日本画像学会誌、第 50 巻、第 5 号、439-447 (2011)
- [9] L. Martinu et.al., 「Properties and stability of diamond-like carbon films related to bonded and unbonded hydrogen」, Diamond and Related Materials, 2 (1993) 673-677
- [10] S. Sainio, D. Nordlund, M.A. Caro, R. Gandhiraman, J. Koehne, N. Wester, J. Koskinen, M. Meyyappan, and T. Laurila, Correlation between  $sp^3$ -to- $sp^2$  Ratio and Surface Oxygen Functionalities in Tetrahedral Amorphous Carbon (ta-C) Thin Film Electrodes and Implications of Their Electrochemical Properties, J. Phys. Chem. C 2016, 120, 8298–8304
- [11] T. Nakamura, T. Ohana, Photochemical modification of DLC films with oxygen

- functionalities and their chemical structure control, *Diamond & Related Materials* 33 (2013) 16–19
- [12] Y. Nitta, K. Okamoto, T. Nakatani, H. Hoshi, A. Homma, E. Tatsumi, Y. Taenaka, Diamond-like carbon thin film with controlled zeta potential for medical material application, *Diamond & Related Materials* 17 (2008) 1972–1976
- [13] M.A. Caro, A. Aarva, V.L. Deringer, G. Csányi, and T. Laurila, *Chemistry of Materials* 30 (2018) 7446–7455
- [14] K. Kanasugi, Y. Ohgoe, K. K. Hirakuri, and Y. Fukui, Cytocompatibility of modified a-C:H film deposited on complicated polymeric medical apparatus, *Journal of Applied Physics* 105 (2009), 094702
- [15] G. Gotzmann, J. Beckmann, B. Scholz, U. Herrmann, C. Wetzel, Low-energy electron-beam modification of DLC coatings reduces cell count while maintaining biocompatibility, *Surface & Coatings Technology* 336 (2018) 34–38
- [16] Y. Nitta, K. Okamoto, T. Nakatani, and M. Shinohara, Effect of the Surface Bond States in as-Deposited DLC Films on the Incorporation of Nitrogen and Oxygen Atoms, *IEEE Transactions on Plasma Science* 40 (2012) 2073–2078

# 3 章 プラズマ後処理を施した DLC 膜の細胞増殖性と最表面組成、 光学定数の関連性

## §3-1.はじめに

第 2 章において、光学定数に基づいて分類された 4 種類の DLC タイプ間の NIH-3T3 細胞増殖性を比較し、相対的に高い消衰係数と C=O 結合比率となる a-C と GLC が、a-C:H や PLC に比べて細胞増殖促進効果が高いことを明らかにした。

a-C や GLC が高い細胞増殖性を示す一方で、a-C:H や PLC は比較的柔軟性があり、ガスバリア性などの魅力的なバルク特性を有する<sup>[1]</sup>。また、a-C:H や PLC の代表的な成膜法であるプラズマ CVD 法は、低温プロセス、立体構造物への成膜が可能といった利点がある<sup>[2]</sup>。つまり、特定用途で求められる要求特性や母材の耐熱性、成膜対象の形状、保有する成膜装置等の制約によっては、DLC タイプの選択肢が制限される場合がある。それ故、DLC タイプに関わらず、各種用途に最適な最表面状態を構築することも重要と考えられる。

DLC 膜の最表面制御手段として、プラズマや真空紫外光（200nm 以下）などを用いた DLC 膜の表面後処理が古くから検討されている<sup>[3-7]</sup>。中でも、プラズマ後処理は、四フッ化炭素（CF<sub>4</sub>）や酸素（O<sub>2</sub>）、アルゴン（Ar）、アンモニア（NH<sub>3</sub>）などの様々な活性、不活性ガスをプロセスガスとして用いることにより、比較的容易に DLC 膜の最表面状態を制御できる<sup>[8-12]</sup>。それ故、NIH-3T3 細胞増殖性と関連性のある DLC の光学的評価指標に基づいて DLC 最表面を改質することで、PLC や a-C:H であっても狙いの NIH-3T3 細胞増殖促進効果が得られるものと考えられる。しかし、それら表面後処理が DLC 膜の光学定数と最表面特性、NIH-3T3 細胞増殖性の関係に及ぼす影響については未知であり、その関係明確化が必

要である。

本章では、第 2 章で導出した光学的評価指標の適用範囲を見極めるために、生体材料の表面改質及び滅菌手段として広く採用されているプラズマ後処理に着目し、人工心臓用血液ポンプ上に成膜した DLC 膜を対象に、光学的評価指標（C=O 結合比率）に基づくプラズマ後処理効果を検証すると共に、プラズマ後処理を施した DLC 膜の光学定数と最表面特性、NIH-3T3 細胞増殖性の関係性について調査した。



## § 3-2. プラズマ後処理による DLC 最表面制御と細胞増殖性

### (1) DLC 成膜条件およびプラズマ後処理条件

本実験では、a-C:H や PLC の代表的な成膜法である高周波プラズマ CVD 法を用いて、細胞接触型医療デバイスの 1 つであるポリウレタン製人工心臓用血液ポンプ上に DLC 膜を約 300nm 成膜した。その際、粒状導電性物質である  $\phi 0.8\text{mm}$  の金属球（Chromium : Cr）を成膜対象物の内部に詰めた立体構造物対応の独自電極を用いた<sup>[13]</sup>。図 3-1 に独自電極を示す。DLC 成膜の際、血液ポンプ上に表面分析用 Si 基板（10mm×10mm）と細胞培養用 PU 基板（10mm×10mm）をそれぞれ設置した。表 3-1 に成膜条件、図 3-2 に CVD 装置概略図を示す。

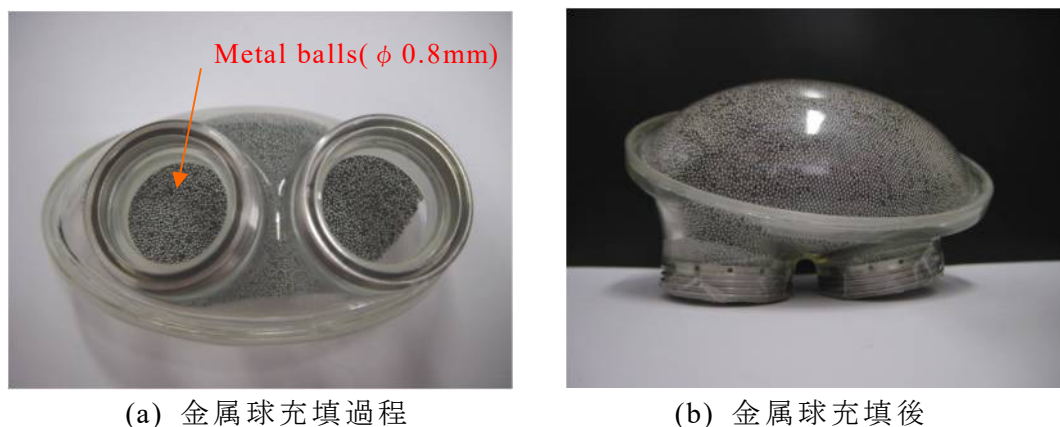


図 3-1 立体構造物に対応した独自電極

表 3-1 DLC 成膜条件

r.f. power [W]	100
Frequency [MHz]	13.56
Source gas	CH <sub>4</sub>
Gas pressure [Pa]	10
Deposition time [min]	30
Gas flow rate [sccm]	0.4

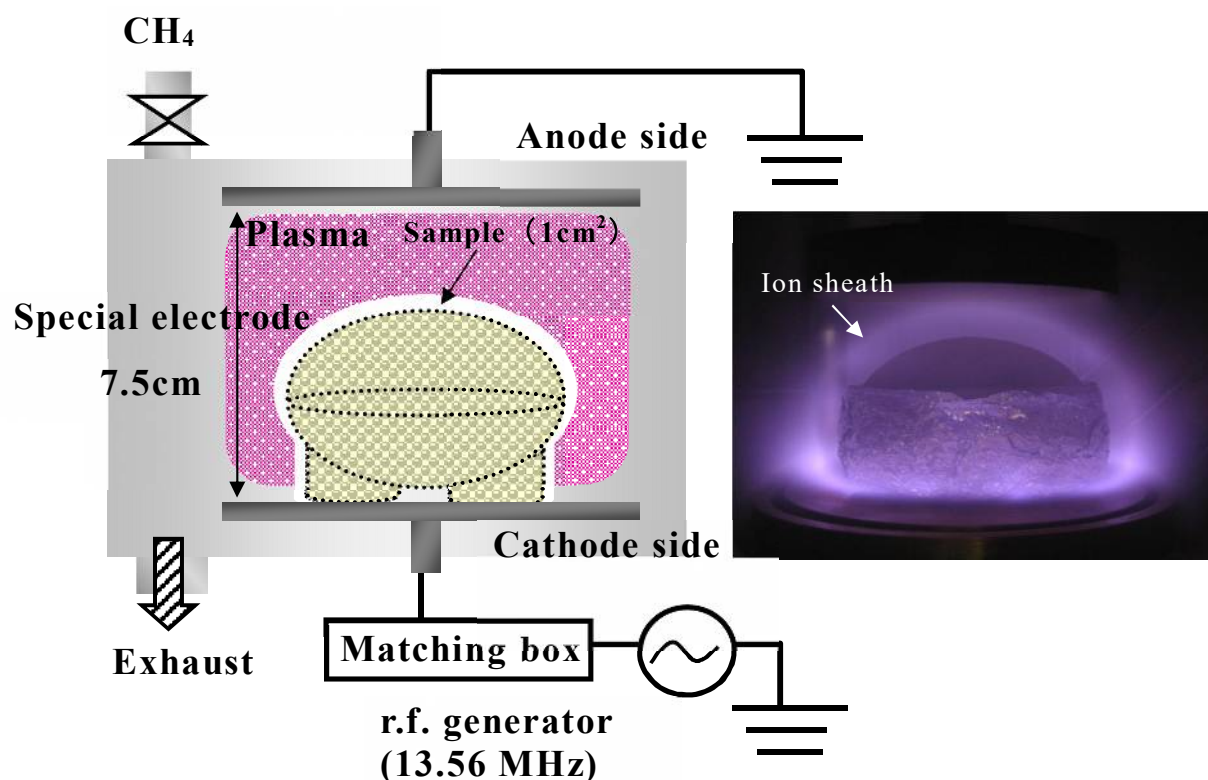


図 3-2 独自電極を用いた高周波プラズマ CVD 装置概略図と放電写真

DLC 膜を成膜した後、同装置において続けてプラズマ後処理を行った。このプラズマ後処理では、DLC 最表面の C=O 結合量の向上（表面酸化）を狙って、酸化性ガスである酸素（ $\text{O}_2$ ）と、比較用に不活性ガスであるアルゴン（Ar）をプロセスガスに用いた。表 3-2 にプラズマ後処理条件を示す。

表 3-2 DLC 膜に対するプラズマ後処理条件

r.f. power [W]	100
Frequency [MHz]	13.56
Source gas	$\text{O}_2$ 、Ar
Gas pressure [Pa]	10
Deposition time [min]	1
Gas flow rate [sccm]	1.5

## (2) AFM 分析

プラズマ後処理前後の DLC 膜の表面性状の変化を明確にするために、まず初めに、原子間力顕微鏡（AFM：Atomic Force Microscopy、JEOL、JSPM-5200）において、プラズマ後処理前後の DLC 表面粗さを確認した（ $n=3-5$ ）。なお、AFM 分析の測定範囲は  $10\mu\text{m}\times 10\mu\text{m}$  とした。

図 3-3、3-4 にプラズマ後処理前後の DLC 膜の表面粗さを示す。結果として、プラズマ後処理を施していない DLC 膜の表面粗さは、 $2.12\text{nm}\pm 0.40\text{nm}$ （平均値 $\pm$ 標準偏差）となった。一般的に DLC 膜の表面粗さは、成膜対象となる母材の影響を強く受ける。そのため、母材として用いた Si 基板の表面粗さが  $1.0\text{nm}\pm 0.35\text{nm}$  であることから、本実験で得られた DLC 膜の表面粗さは妥当な値と考えられる。一方、Ar プラズマ後処理（Ar-DLC）および  $\text{O}_2$  プラズマ後処理（ $\text{O}_2$ -DLC）を施した DLC 膜の表面粗さは、 $2.11\pm 1.30\text{nm}$ 、 $3.7\text{nm}\pm 1.91\text{nm}$  であった。いずれも測定誤差範囲にあり、プラズマ後処理前後の DLC 膜の表面粗さの差は無いものと考えられる。

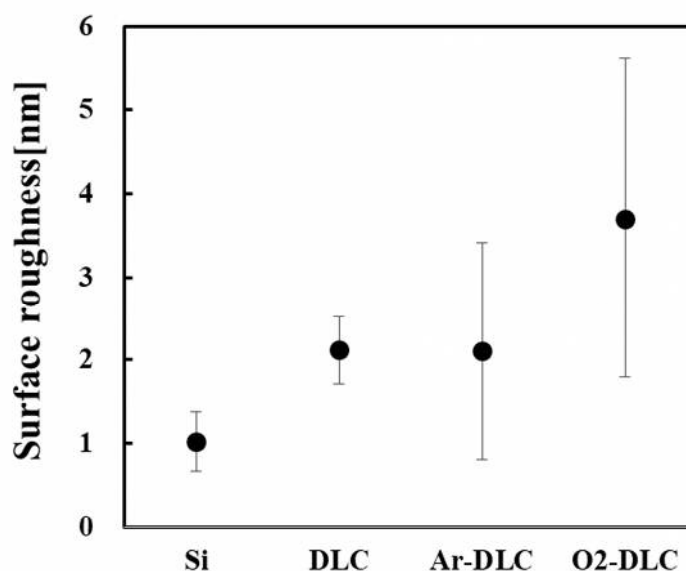


図 3-3 プラズマ後処理前後の DLC 膜の表面粗さ

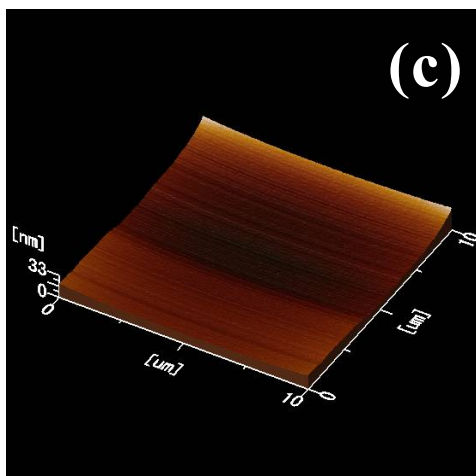
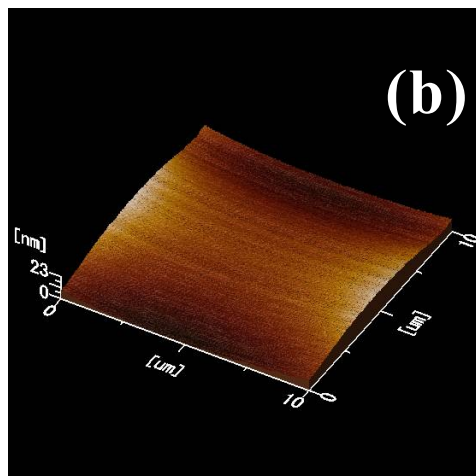
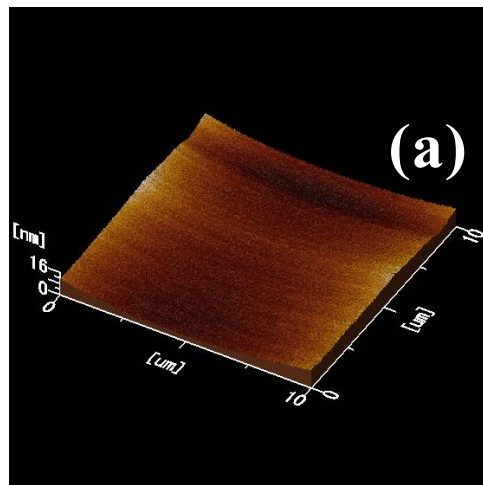


図 3-4 プラズマ表面処理有無に対する DLC 膜の AFM 画像

(a) DLC、(b) Ar-DLC、(c) O<sub>2</sub>-DLC

## (2) XPS 分析

次に、プラズマ後処理前後の DLC 最表面組成を確認するために、XPS 分析を実施した。XPS 分析では、Carbon 1s (C1s) と Oxygen 1s (O1s) スペクトルを測定した。そして、各 DLC 最表面の酸化度合を比較するために、C1s ピークと O1s ピークの最大強度を抽出し、その強度比を比較した。この際、C1s ピークを 1.00 に規格化している。図 3-5 に XPS スペクトルと強度比を示す。また、DLC 最表面の結合成分比率の変化を確認するために、第 2 章同様、C1s スペクトルの波形分離を行った。表 3-3 にプラズマ後処理前後の DLC 最表面の各結合成分比率を示す。

結果として、DLC 膜に対して Ar および O<sub>2</sub> プラズマ後処理を施すことにより、いずれのプロセスガスにおいても、O1s ピークの強度比が高くなることを確認した。また、プラズマ後処理を施した DLC 最表面の C-O、C=O、O=C-O 結合比率が全て向上することが分かった。更に、プロセスガス種の違いを比較すると、Ar ガスに比べて O<sub>2</sub> ガスを用いたプラズマ後処理の方が、DLC 表面酸化が進行することを確認した。

表 3-3 プラズマ後処理前後の DLC 最表面の各結合成分比率

Sample	XPS C1s [atm.%]				
	C-C sp <sup>2</sup>	C-C sp <sup>3</sup>	C-O	C=O	O=C-O
DLC	74.2	24.0	0.3	0.3	1.1
Ar-DLC	71.7	22.6	2.7	1.1	2.0
O <sub>2</sub> -DLC	68.6	21.8	4.3	3.1	2.2

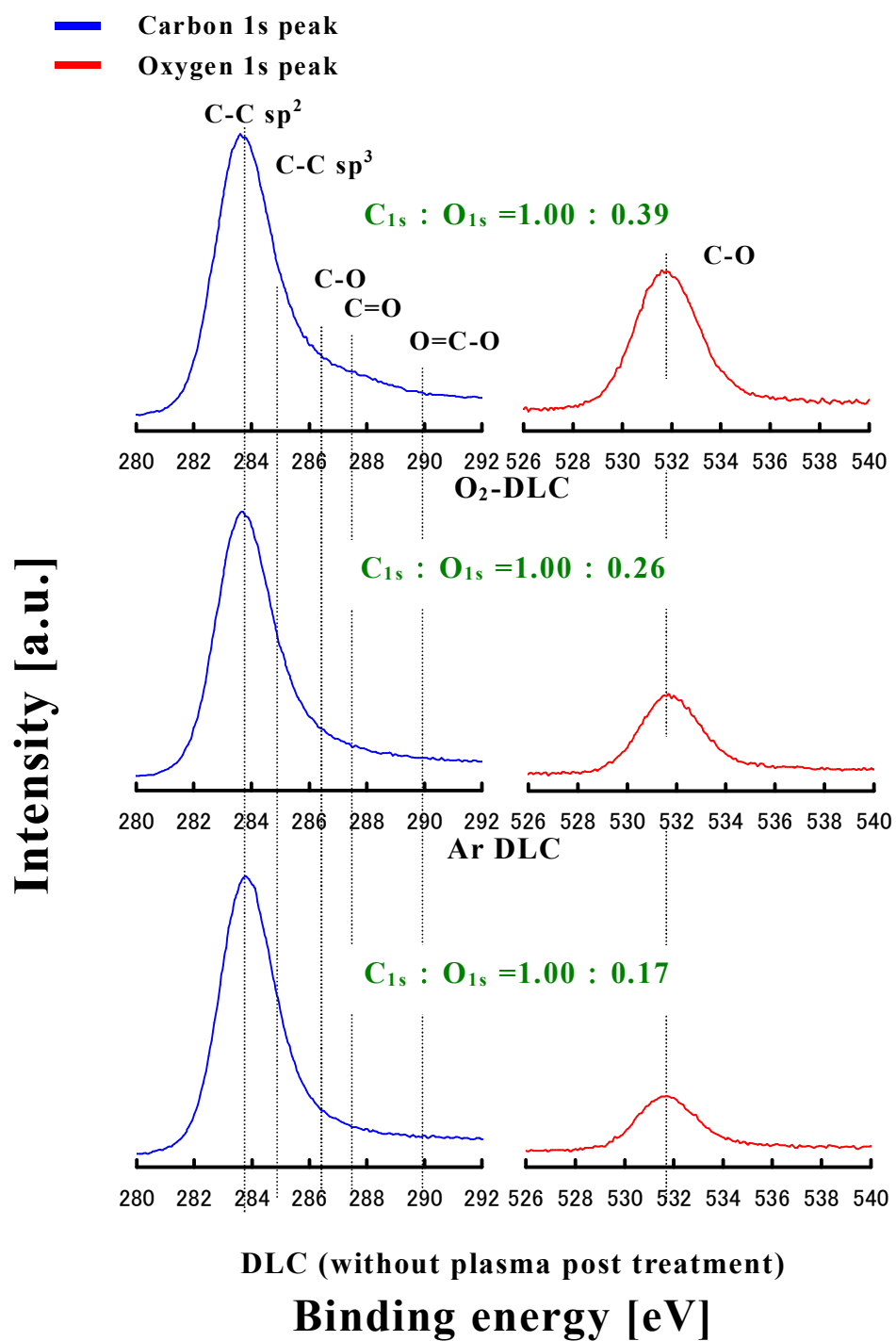
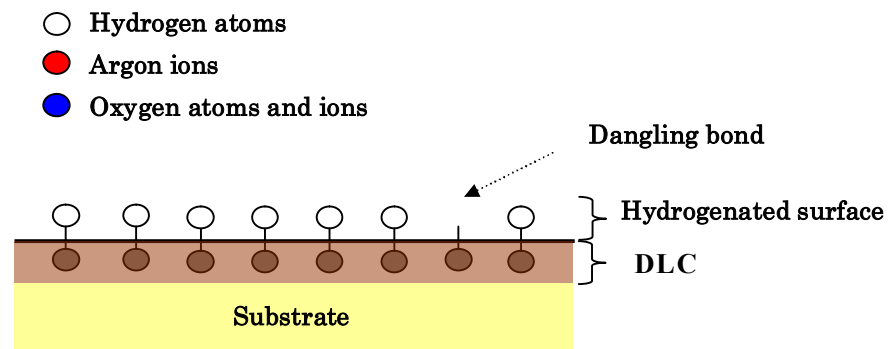


図 3-5 プラズマ後処理前後の DLC 膜の XPS スペクトル

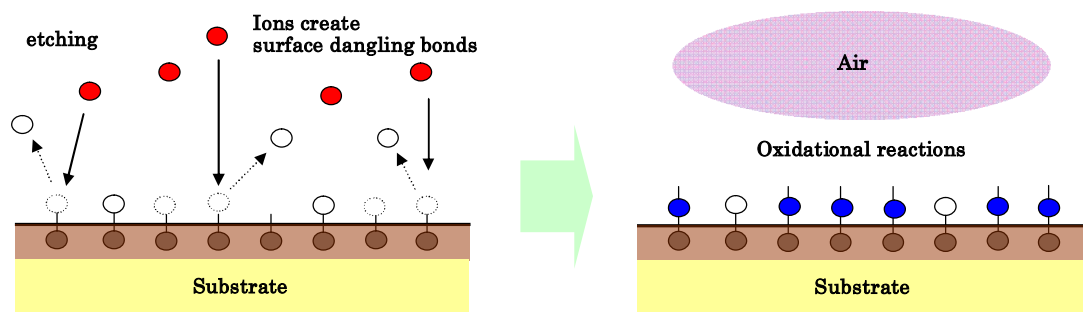
プラズマ後処理による DLC 最表面の酸化過程を考察する。

本実験では、原料に炭化水素ガスを用いているため、プラズマ後処理を施していない DLC 膜表面は、水素が終端されているものと考えられる (図 3-6 (a))<sup>[14]</sup>。その DLC 表面に、不活性ガスである Ar ガスを用いた Ar プラズマ後処理を施した場合、DLC 最表面の C-H や C-C 結合がイオン衝撃によって無作為に結合解離し、その未結合手となった部分に大気中の水分や酸素が化学吸着することで、水酸基 (OH) やケトン基 (C=O)、カルボキシル基 (COOH) などの酸素官能基が生成したものと考えられる。つまり、Ar プラズマ後処理では、未結合手生成後の大気中での第二の反応が DLC 最表面組成に強く関与しているものと考えられる (図 3-6 (b))。

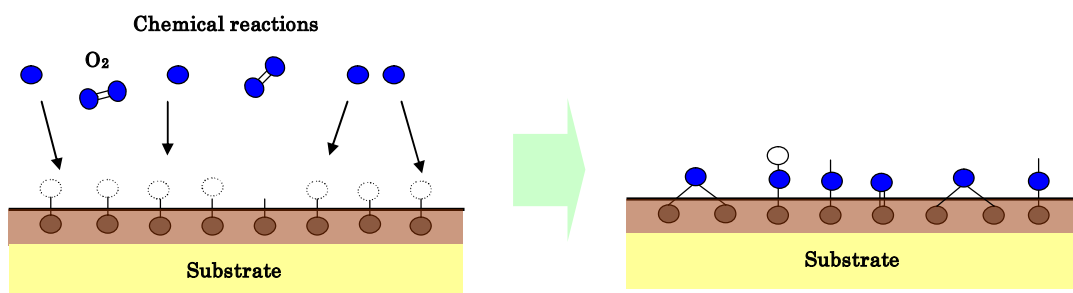
一方、酸化性ガスである O<sub>2</sub> ガスを用いた O<sub>2</sub> プラズマ後処理では、DLC 表面へのイオン衝撃に加えて、酸素ラジカルなどの活性種が C-H や C-C 結合と化学反応を引き起こすことで、DLC 最表面に酸素官能基を生成しているものと考えられる。Ar プラズマ後処理同様、O<sub>2</sub> プラズマ後処理でもイオン衝撃によって未結合手が生成され、大気中での酸化反応は生じるものと考えられるが、O<sub>2</sub> プラズマ後処理過程における活性種の存在が DLC 表面酸化の進行を加速させているものと考えられる。(図 3-6 (c))。



(a) DLC film without plasma post-treatment



(b) Reactions of DLC surface for Ar plasma post-treatment



(c) Reactions of DLC surface for O<sub>2</sub> plasma post-treatment

図 3-6 Ar および O<sub>2</sub> プラズマ後処理による DLC 膜の酸化過程



### (3) 濡れ性評価

XPS 分析の結果、プラズマ後処理による DLC 最表面の酸化促進効果が確認された。この表面酸化は、細胞接着の重要因子となる DLC 表面の濡れ性も変化させているものと考えられる。そこで、測定液に純水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) とエチレングリコール ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}_2$ ) を用いた静的接触角測定を行った。その接触角測定は、室温 ( $20^\circ\text{C}$ ) において、 $\theta/2$  法により評価した ( $n=3$ )。測定液は DLC 表面に  $2\mu\text{L}$  滴下した。

静的接触角測定の結果を図 3-7 に示す。結果として、プラズマ後処理を施していない DLC 膜の静的接触角は、純水が  $78.0^\circ$ 、エチレングリコールが  $47.3^\circ$  となった。一方、Ar および  $\text{O}_2$  プラズマ後処理を施した DLC 膜の静的接触角は、いずれも親液化し、特に  $\text{O}_2$  プラズマ後処理が顕著に親液化することを確認した。静的接触角は基材表面粗さにも依存するが、本サンプルの表面粗さの差は数 nm 程度であることからその影響は小さいものと考えられる。

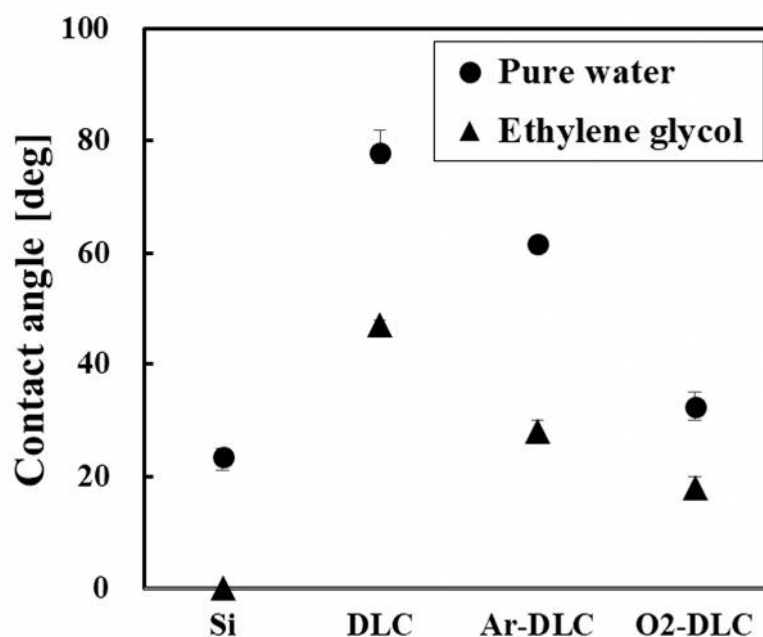


図 3-7 プラズマ後処理前後の DLC 膜の静的接触角

更に、得られた静的接触角平均値を基に、DLC 膜の表面自由エネルギー[mJ/m<sup>2</sup>]を Young 式①と Owens 式②により算出した。

$$\gamma_L \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad \dots \dots \dots \text{①}$$

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^d \cdot \gamma_L^d} - 2\sqrt{\gamma_S^p \cdot \gamma_L^p} \quad \dots \dots \dots \text{②}$$

$\gamma_L$  : 液体の表面自由エネルギー  $\gamma_L^d$  : 液体の分散成分  $\gamma_L^p$  : 液体の極性成分

$\gamma_S$  : DLC 膜の表面自由エネルギー  $\gamma_S^d$  : DLC の分散成分  $\gamma_S^p$  : DLC の極性成分

$\gamma_{SL}$  : DLC 膜と液体間の界面の表面自由エネルギー

この際、純水とエチレングリコールの室温 (T=20℃) における液体の表面自由エネルギーを式③、④より算出した。液体の表面自由エネルギーの値を表 3-4 に示す<sup>[15]</sup>。

$$\gamma_{L(\text{purewater})} = 235.8 \left( \frac{374-T}{647.15} \right)^{1.256} \left[ 1 - 0.625 \frac{374-T}{647.15} \right] \quad \dots \dots \dots \text{③}$$

$$\gamma_{L(\text{Ethylene glycol})} = 48.97 - \frac{T}{15} \quad \dots \dots \dots \text{④}$$

表 3-4 室温における液体の表面自由エネルギー (mJ/m<sup>2</sup>)

Liquids	Temperature (°C)	$\gamma_L$	$\gamma_L^d$	$\gamma_L^p$
Pure water	20	72.8	21.8	51.0
Ethylene glycol		48.0	29.0	19.0

Young 式と Owens 式により算出した DLC 膜の表面自由エネルギーを図 3-8 に示す。また、図中に表面自由エネルギーの極性成分と分散成分値をそれぞれ示した。

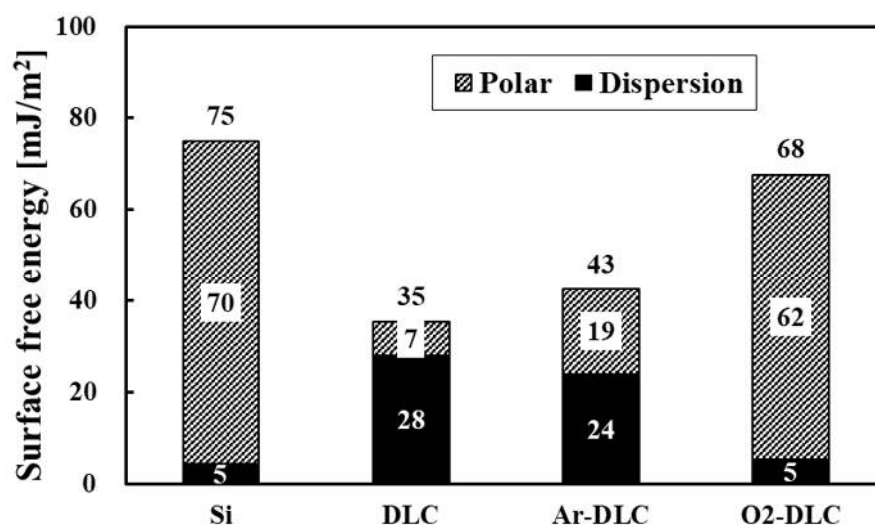


図 3-8 プラズマ表面処理前後の DLC 膜の表面自由エネルギー

結果として、DLC 表面の表面自由エネルギーはプラズマ後処理を施すことでそれぞれ向上していることが分かった。特に、表面自由エネルギーの極性成分が増加していることを確認した。カルボキシル基やケトン基などの酸素官能基は極性度が大きいことから、この極性成分の増加は、DLC 表面の酸素官能基の導入によるものと考えられる<sup>[16]</sup>。つまり、Ar または O<sub>2</sub> プラズマ後処理によって DLC 表面が酸化し、表面自由エネルギーが向上することで、DLC 表面が親液化したことが示唆される。

#### (4) *in-vitro* 細胞培養試験

*in-vitro* 試験による細胞培養試験では、第 2 章同様に、マウス由来の繊維芽細胞 (NIH-3T3) を用いた。細胞培養条件を表 3-5 に示す。

表 3-5 細胞培養条件

Cell	Mouse fibroblast (NIH-3T3)
Seeding density	$2 \times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup>
Medium	D-MEM containing 10% fetal bovine serum
CO <sub>2</sub> concentration	5.0%
Temperature	37.0°C
Incubation time	96 h
pH	6.8–7.2

本実験では、表 3-1、3-2 に示す条件にて、血液ポンプと同じ材質であるポリウレタン基板 (10mm×10mm) 上に DLC 膜を成膜した。24 穴の培養プレートウェル (Falcon 353047、Becton、Dickinson and Co.、New Jersey、USA) 内に、それらサンプル (n=3) をそれぞれ配置した。

培養後、血球計算板 (Neubauer hemocytometer: Model A116、Sun Lead Glass Co. Ltd.、Tokyo、Japan) と光学顕微鏡 (Model 301-135.001、Leica Co. Ltd.、Tokyo Japan) を用いて、各サンプル表面上に付着した細胞数を計数した。そして、前章同様、各サンプル間の細胞数の有意差を t 検定にて確認した。

また、96 時間培養された DLC サンプルについて、凍結保存処理を行い、その表面に付着した細胞の形態を走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) により観察した。

結果を図 3-9、3-10 に示す。

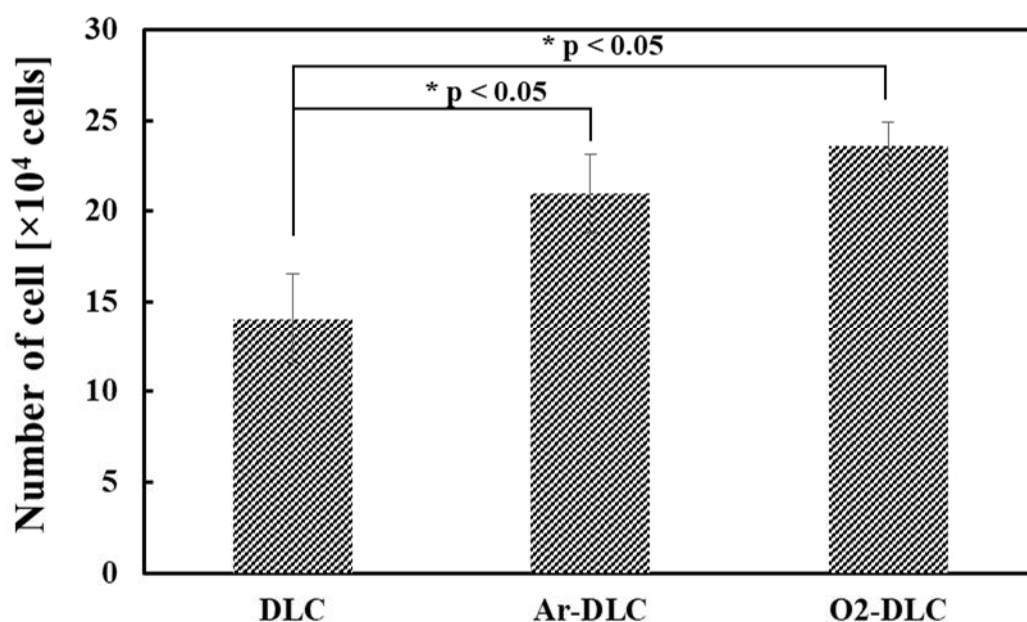


図 3-9 プラズマ表面処理前後の DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖性

結果として、いずれの DLC サンプルにおいても、NIH-3T3 細胞が DLC 表面に存在していることを確認した。そして、DLC 膜に対して Ar または  $O_2$  プラズマ後処理を施すことで細胞増殖性が促進することが分かった ( $p < 0.05$ )。また、96 時間後の細胞形態画像を確認した結果、すべての DLC サンプル表面において、安定して NIH-3T3 細胞が接着している様子が見られ、プラズマ後処理を施した DLC 表面において広範に細胞が接着している様子が見られた。この細胞増殖の促進は、DLC 膜の表面酸化に伴う、表面自由エネルギーの向上が寄与しているものと考えられる。一方で、Ar と  $O_2$  プラズマ後処理を比較した場合、96 時間後の細胞増殖促進効果に有意な差は見られなかった。これは DLC 最表面が一定以上酸化すると NIH-3T3 細胞増殖促進の寄与度が小さくなるためと推測する。

以上の結果から、Ar、 $O_2$  プラズマ後処理は DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖性を促進させる効果的な手段であることが示された。そして、そのプラズマ後処理効果を簡易的に判断する上で、C=O 結合比率を含む表面酸化状態や濡れ性が有効な表面指標になることが示唆された。

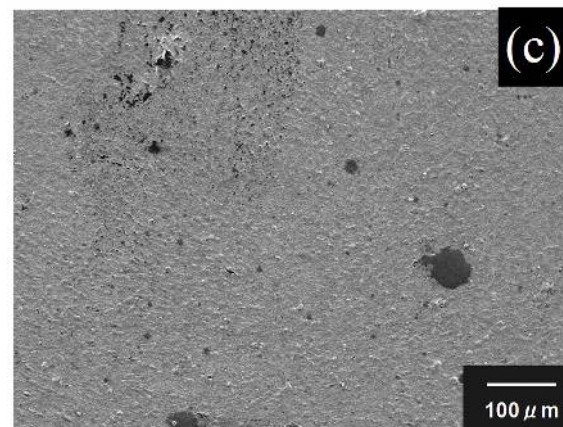
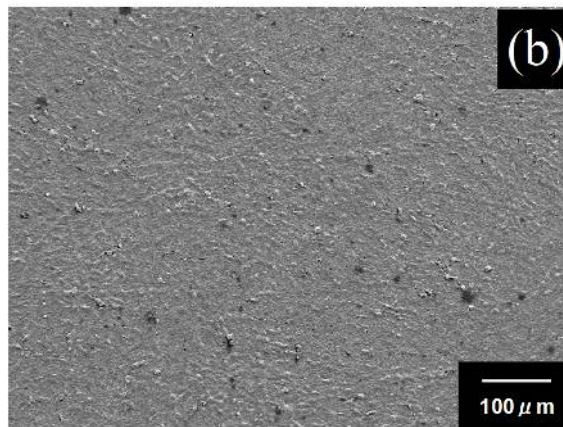
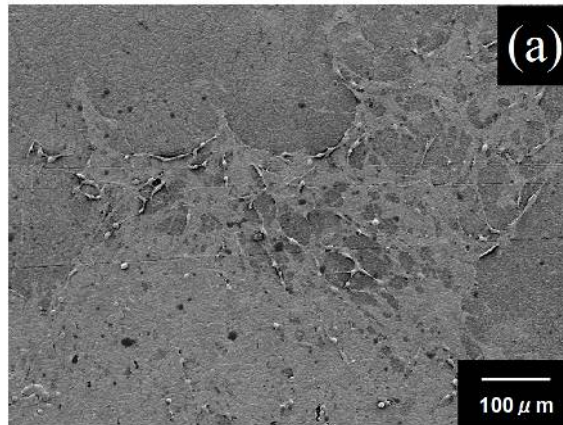


図 3-10 96 時間後の細胞の SEM 画像  
((a)DLC、(b) Ar-DLC、(c) O<sub>2</sub>-DLC)

### § 3-3. プラズマ後処理が DLC 膜の光学定数に与える影響

#### (1) DLC 成膜条件およびプラズマ後処理条件

本項ではプラズマ後処理が DLC 膜の光学定数に与える影響を確認するために SE 分析を実施した。

DLC サンプルは高周波プラズマ CVD 法において、Si 基板（10m×10mm）上に DLC 膜を成膜した。なお、本実験では平行平板電極を用いた。そして、DLC 成膜後に Ar、O<sub>2</sub> プラズマ後処理を施した。この際、プラズマ後処理時間の影響を確認するために、その処理時間を 10、30、60sec でそれぞれ制御した。各条件を表 3-6、3-7 に示す。

表 3-6 DLC 成膜条件

r.f. power [W]	200
Frequency [MHz]	13.56
Source gas	CH <sub>4</sub>
Gas pressure [Pa]	50
Deposition time [min]	13
Gas flow rate [sccm]	37

表 3-7 DLC 膜に対するプラズマ後処理条件

r.f. power [W]	200
Frequency [MHz]	13.56
Source gas	O <sub>2</sub> 、Ar
Gas pressure [Pa]	50
Deposition time [sec]	10、30、60

## (2) 濡れ性評価

本実験のプラズマ後処理効果を確認するために、前項同様、純水を用いた静的接触角測定を行った。表 3-8 に各 DLC サンプルの純水接触角値（平均値±標準偏差）を示す。結果として、前項同様、Ar および O<sub>2</sub> プラズマ後処理後に DLC 表面がそれぞれ親水化することを確認した。また、それらプラズマ後処理時間に対する接触角値の差異は見られなかった。これはプラズマ後処理時間が少なくとも 10sec 以上であれば、各後処理による表面酸化が十分に進行しているためと考えられる。

## (3) SE 分析

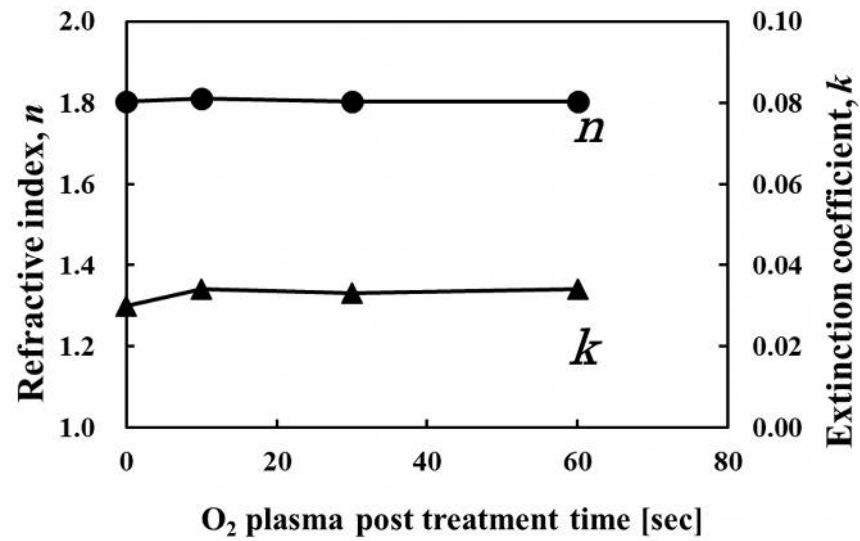
SE 分析(UVISEL PIUS 1012, HORIBA, Ltd., Japan)において、プラズマ後処理を施した各 DLC サンプルの光学定数を評価した。SE 分析条件は、第 2 章同様、入射角を 70°に固定した SE 装置において、波長 191～2066 nm（光子エネルギー0.6～6.5eV）の s 偏光と p 偏光の反射振幅比角（ $\psi$ ）と位相差（ $\Delta$ ）を測定した。なお、スポットサイズは 1mm×3mm の楕円形状とした。そして、 $\psi$  と  $\Delta$  の実測スペクトルを基に、平均二乗誤差（ $\chi^2$ ）が小さくなるよう、DLC 膜層／下地構造を想定した仮想の薄膜多層モデルによる回帰分析を実施した。なお、DLC 膜層の解析モデルには Tauc-Lorentz 分散式を用いた。

表 3-8 に SE 分析により同定した各 DLC サンプルの光学定数（ $\lambda=550\text{nm}$ ）、膜厚、 $\chi^2$ を示す。また、図 3-11 に Ar、O<sub>2</sub> プラズマ後処理時間に対する光学定数（n、k）の変化を示す。なお、図中の 0sec のプロットはプラズマ後処理を施していない DLC 膜の光学定数である。

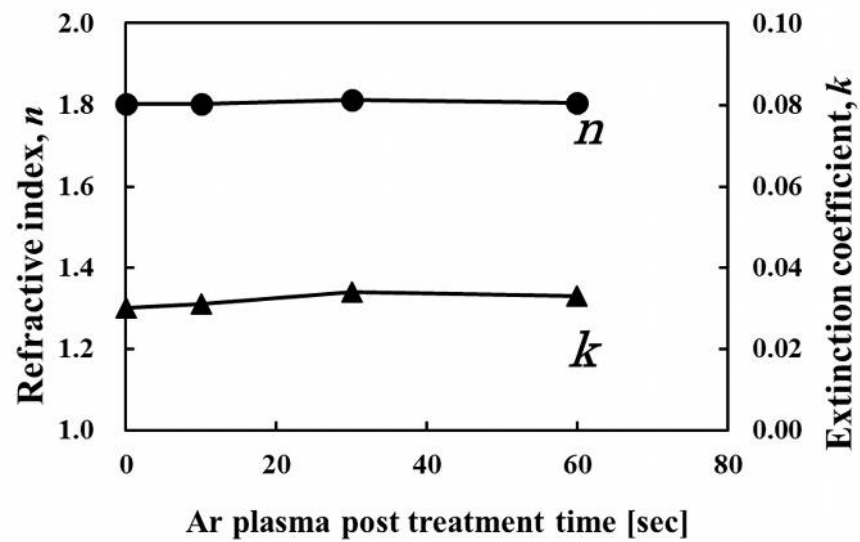


表 3-8 SE 分析結果と純水接触角

Sample/ treatment time		DLC type	$\chi^2$	film thickness [nm]	n	k	Pure water contact angle [deg]
					$\lambda = 550\text{nm}$		
DLC	0sec	PLC	2.35	210	1.80	0.03	84.8±5.5 (n=6)
Ar-DLC	10sec	PLC	1.95	205	1.80	0.03	43.3±3.1 (n=3)
	30sec	PLC	2.17	207	1.81	0.03	34.7±3.1 (n=3)
	60sec	PLC	2.00	187	1.81	0.03	40.0±3.5 (n=3)
O <sub>2</sub> -DLC	10sec	PLC	2.13	202	1.81	0.03	24.0±4.0 (n=3)
	30sec	PLC	2.03	192	1.80	0.03	24.0±3.5 (n=3)
	60sec	PLC	2.37	171	1.80	0.03	21.3±3.1 (n=3)



(a) O<sub>2</sub>-DLC



(b) Ar-DLC

図 3-11 プラズマ後処理時間に対する DLC 膜の光学定数変化

SE 分析の結果、 $\chi^2$  が十分に小さくなっていることから回帰分析が正しく出来ているものと考えられる。プラズマ後処理を施していない DLC 膜の屈折率は 1.80、消衰係数は 0.03 であり、n-k 法に基づいて DLC タイプを分類すると PLC となった。第 2 章で述べたように、PLC のような比較的水素含有量が多いタイプは、 $sp^2$  サイトにおける多量の  $\pi$ - $\pi^*$  結合の減少を引き起こし、消衰係数が低くなる。また、Ar または  $O_2$  プラズマ後処理前後の DLC 膜の屈折率は 1.80-1.81、消衰係数は 0.03 となり、ガス種や処理時間に関わらず、光学定数の顕著な変化は確認されなかった。この光学定数は DLC 膜構造に強く依存する。従って、少なくとも本実験のプラズマ後処理は DLC の膜構造に影響を与えていないものと考えられる。

以上の結果から、Ar、 $O_2$  プラズマ後処理は DLC 膜構造に依存する光学定数に影響を与えずに最表層のみを改質するための有効な手段になることを実証した。一方で、プラズマ後処理が施された DLC 膜は、前章で明らかにした DLC 膜の細胞増殖性と消衰係数、C=O 結合比率の関係が成立しなくなる場合があることを示唆した。

### § 3-4.本章のまとめ

本章では、第 2 章で導出した光学的評価指標の適用範囲を見極めるために DLC の高機能化及び滅菌手段として広く採用されているプラズマ後処理に着目し、細胞接触型医療デバイスの 1 つである人工心臓用血液ポンプ上に成膜した DLC 膜を対象に、光学的評価指標（C=O 結合比率）に基づくプラズマ後処理効果を検証すると共に、プラズマ後処理を施した DLC 膜の光学定数と最表面特性、NIH-3T3 細胞増殖性の関係性について調査した。結果を以下に列記する。

- ① DLC 膜に対して Ar または O<sub>2</sub> プラズマ後処理を施すことで、C=O 結合比率を含む酸素結合量の増加と、表面自由エネルギーの向上（親液化）を引き起こし、NIH-3T3 細胞増殖の更なる促進を実現した。つまり、第 2 章で提言した光学的評価指標の 1 つである DLC 膜の C=O 結合比率に基づいてプラズマ後処理を施すことで NIH-3T3 細胞増殖性が制御できることを証明した。
- ② 一方で、プラズマ後処理前後の DLC 膜の光学定数は、少なくとも本実験のプラズマ後処理条件範囲では、膜構造に依存する屈折率や消衰係数に影響を与えないことを明らかにした。つまり、DLC 膜に対してプラズマ後処理を施すことで、前章で示した DLC 膜の消衰係数と C=O 結合比率の関係が成立しなくなる場合があることを示唆した。
- ③ 今後、光学定数に基づいた DLC 膜の生体適合性に関する ISO 規格化を進めるためには、医療現場で必須となる滅菌や洗浄などの表面後処理方式や条件の基準化や体系化が必要である。また、表面後処理を施した DLC 膜を光学的に評価するためには、最表面組成（C=O 結合比率）を指標にすることが有用と考えられる。

## 参考文献

- [1] ニューダイヤモンドフォーラム HP「ダイヤモンドライクカーボン (DLC) とは」
- [2] 三菱重工食品包装機械(株)、「ペットボトル用高速・高バリア性 DLC コーティング装置」、三菱重工技報 Vol.49 No.4 (2012)
- [3] Deok Yong Yun et.al.、「Effect of H<sub>2</sub> and O<sub>2</sub> plasma etching treatment on the surface of diamond-like carbon thin film」、Applied Surface Science 254 (2008) 7925–7928
- [4] 野老山 貴行 他、「ダイヤモンドライクカーボン膜の大気中摩擦係数に及ぼす紫外線照射の影響」、日本機械学会論文集 76 巻 771 号(2010-11)
- [5] Satoshi Murata et.al.、「Biochip applications of DLC films on a resin material」Phys. Status Solidi C 9, No. 6, 1439–1442 (2012)
- [6] Kengo Sakurai et.al.、「Evaluation of sliding properties and durability of DLC coating for medical devices」Diamond & Related Materials 96 (2019) 97–103
- [7] Shu Onodera et.al.、「Antibacterial property of F doped DLC film with plasma treatment」Diamond & Related Materials 107 (2020) 107835
- [8] 金杉和弥 他、「DLC 膜の細胞接着制御」、表面 Vol. 45, No 12 pp.9-16 (2007)
- [9] K. Kanasugi et.al.、「Cytocompatibility of modified a-C:H film deposited on complicated polymeric medical apparatus」Journal of applied physics Vol. 105 No. 9, 094702 1-5, 2009.
- [10] C. Jongwannasiri et.al.、「Tribological behavior of O<sub>2</sub> and CF<sub>4</sub> plasma post-treated diamond-like carbon films under dry air and in a high relative humidity environment」、Surface & Coatings Technology 306 (2016) 200–204
- [11] 中東 孝浩、「DLC 摩擦特性に対する湿度の影響」、日本トライボロジー学会トライボロジー会議予稿集（東京 2004 5）
- [12] 中谷 達之、「生体適合 DLC コーティングの医療機器への応用」、表面技術 Vol.67 No.6, 2016

- [13] K. Kanasugi et.al., 「Diamond-like carbon film deposition on an artificial heart blood pump using a free-shape type electrode with r.f. plasma CVD processing」  
Mater. Res. Soc. Symp. Proc. Vol. 956, 2006 (Proceedings)
- [14] J. Robertson, 「Diamond-like amorphous carbon」、Materials Science and Engineering R37, pp. 129-281 (2002)
- [15] X. B. Yan et.al., 「Water-repellency and surface free energy of a-C:H films prepared by heat-treatment of polymer precursor」、Diamond & Related Materials 14, pp. 1342-1347 (2005)
- [16] F. Piazza et.al., 「Wettability of hydrogenated tetrahedral amorphous carbon」、Diamond & Related Materials 18 (2009) 43–50

## 4 章 繊維状素材に成膜した DLC 膜の細胞増殖性と最表面組成、 光学定数の関連性

### §4-1.はじめに

第 2、3 章では、DLC 膜自体の細胞応答性を判断するために、下地構造の影響が低いと考えられる平滑な平面基板上に各種成膜法で作製した DLC サンプルについて評価を行ってきた。そして、いずれの DLC 膜においても良好な細胞増殖性が得られた。しかし、細胞の分化や増殖には、細胞の足場となる母材の下地構造が極めて重要とされており、これまでに DLC 表面粗さが細胞増殖性に影響を与えることが報告されている<sup>[1-3]</sup>。そのため、DLC 膜を実際の細胞接触型医療デバイスに応用展開していくためには、成膜対象となる母材の下地構造も含めた DLC コーティングの有効性を証明しておく必要がある。特に、細胞接触型医療デバイスの 1 つである人工血管では、ポリエステルなどの化学繊維や繊維状多孔質構造を持つ延伸ポリテトラフルオロエチレン（expanded polytetrafluoroethylene：ePTFE）等の素材が用いられており、それら繊維状素材に成膜した DLC 膜の細胞増殖効果の確認が必須である<sup>[4]</sup>。

一方、繊維状素材に成膜した DLC 膜の光学定数を評価した報告例は無い。上述した繊維状多孔質構造を有する ePTFE は、数ミクロンから数百ミクロンオーダーの無数の空孔（void）が基材に存在することから、平滑な平板基板同様の SE スペクトルが得られない可能性がある<sup>[5]</sup>。

本章では、ePTFE 人工血管内壁に成膜した DLC 膜を対象に、その繊維状構造物に対する DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖促進効果を検証すると共に、その NIH-3T3 細胞増殖性と最表面特性、光学定数の関係性について調査した。

## § 4-2.ePTFE 人工血管への DLC 成膜

### (1) DLC 成膜条件

本実験では、対象物外周を導電性部材で覆う円筒構造物対応の独自電極を用いた高周波プラズマ CVD 法において、ePTFE (model GR-143030, W. L. Gore & Associates, Inc.,USA) 内壁に DLC 膜を成膜した<sup>[6-8]</sup>。ePTFE の内径は、 $\phi 14\text{mm}$ 、その長さは 50mm である。DLC 成膜装置概略図を 4-1、成膜条件を表 4-1 に示す。

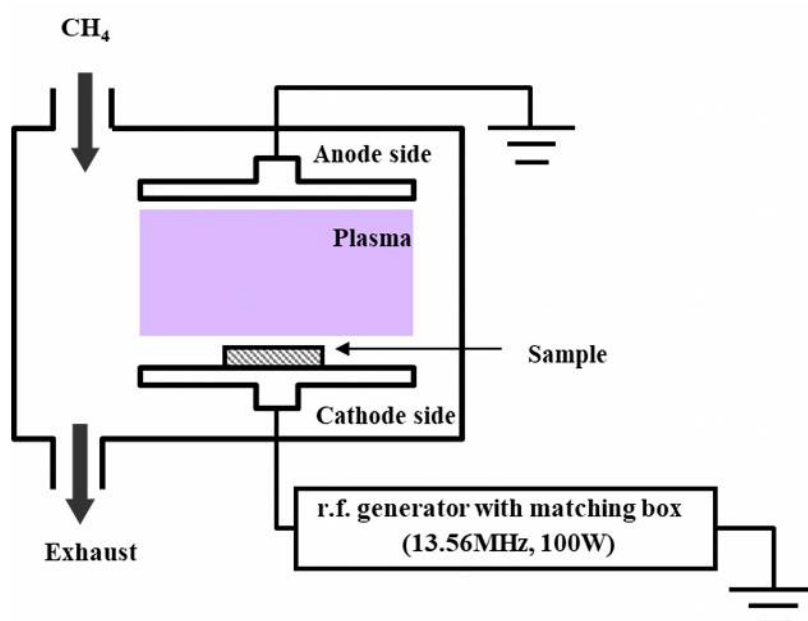


図 4-1 DLC 成膜装置概略図

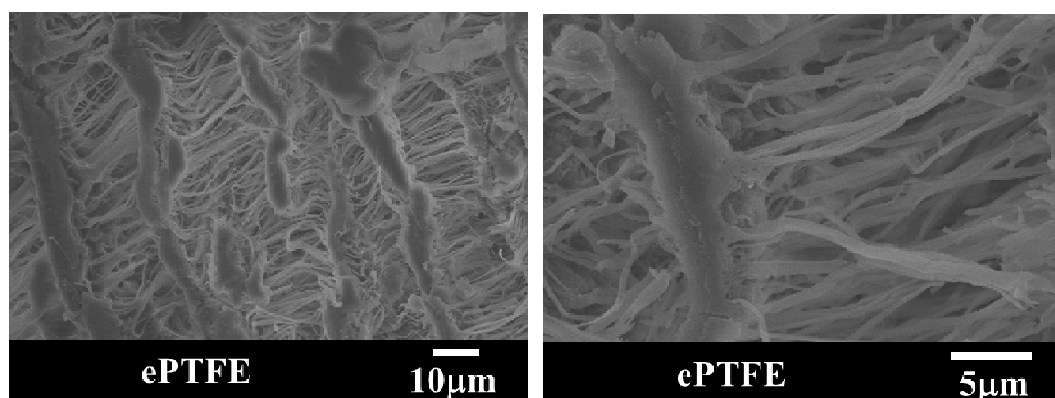
表 4-1 DLC 成膜条件

r.f. power [W]	100
Frequency [MHz]	13.56
Source gas	$\text{CH}_4$
Gas pressure [Pa]	10
Deposition time [min]	30
Gas flow rate [sccm]	0.4

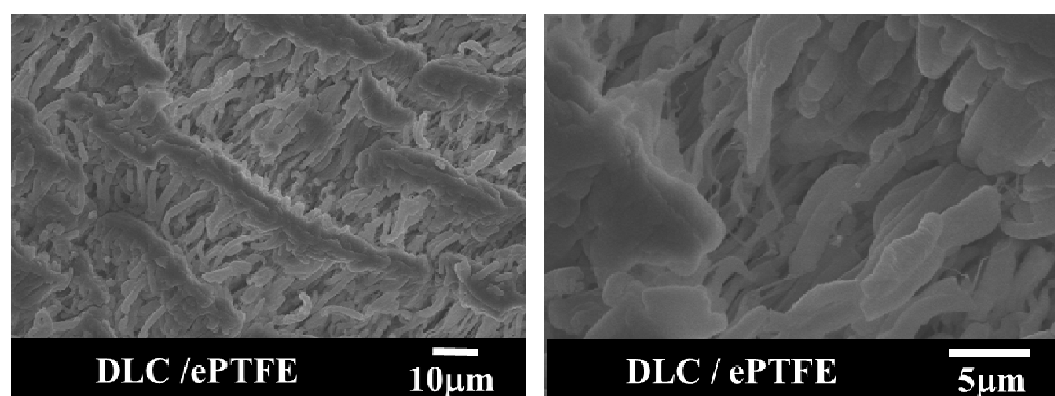


## (2) SEM 分析

DLC 成膜前後の ePTFE 人工血管内壁の SEM 画像を図 4-2 に示す。SEM 画像の結果、DLC 成膜後も成膜前同様、径の異なる複数の繊維が複雑に枝分かれしており、それら繊維間にミクロンオーダーの無数の空孔が基材表面に維持されていることを確認した。また、個々の繊維を詳細に観察すると、DLC 成膜後に 1 ミクロン程度ではあるが、それら繊維径が太くなっている様子が見られた。この個々の繊維増径が、DLC 膜の被覆を示唆している<sup>[6-7]</sup>。



(b)without DLC coating



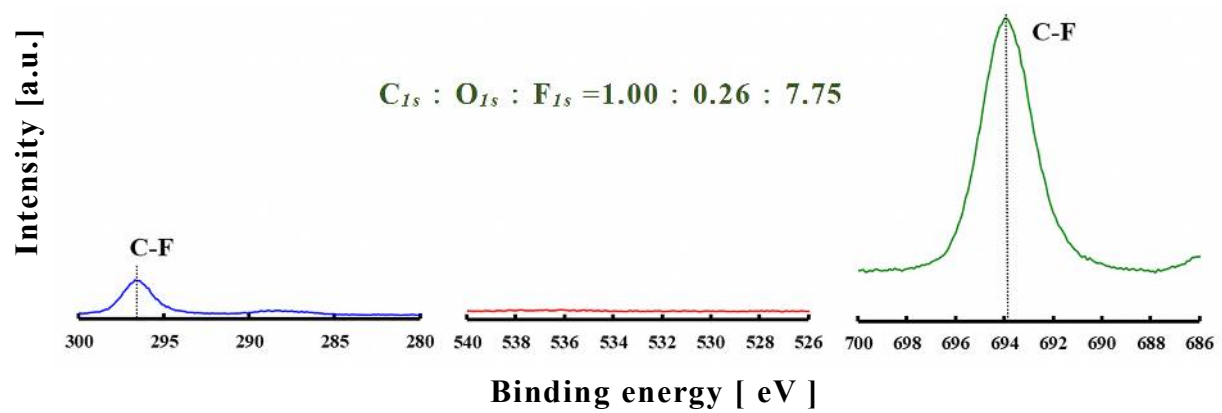
(a)with DLC coating

図 4-2 DLC 成膜前後の SEM 画像

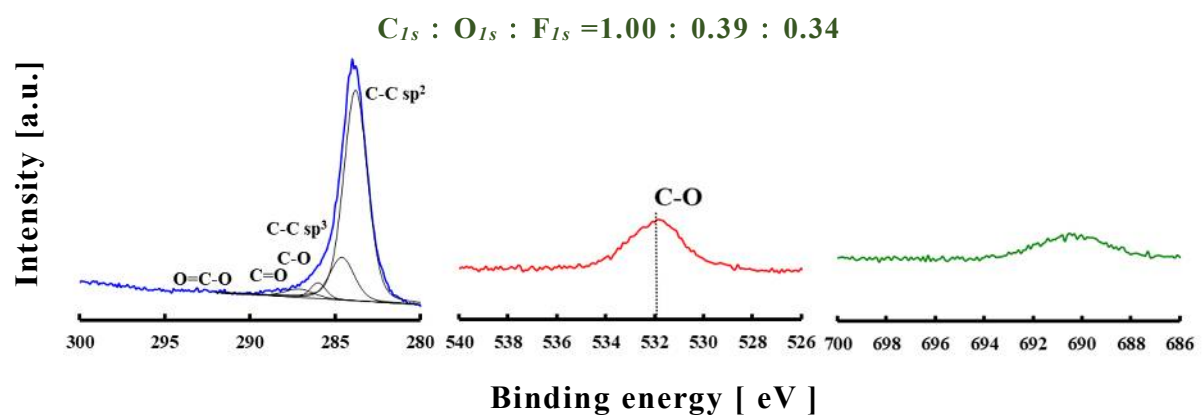
### (3) XPS 分析

次に、DLC 成膜前後の最表面組成を確認するために XPS 分析を実施した（図 4-3）。XPS 分析では、Carbon 1s (C1s) と Oxygen 1s (O1s)、Fluorine 1s (F1s) スペクトルを測定した。そして、C1s 最大ピーク強度を基準にして O1s と F1s 最大ピークの強度比を求めた。この際、C1s ピークを 1.00 に規格化している。また、DLC 最表面の各結合成分比率を確認するために、前章同様、C1s スペクトルの波形分離を行った。表 4-2 に ePTFE に成膜した DLC 最表面の各結合成分比率を示す。

結果として、DLC 成膜後に ePTFE の主成分である C-F ピークが低下し、DLC 膜由来の C-C や第 2 章で導出した光学的評価指標の 1 つである C=O ピークが顕著に出現することを確認した。SEM 画像に加え、この DLC 成膜前後の XPS スペクトル変化からも、ePTFE に DLC 膜が被覆していることが示唆される。



(b) without DLC coating



(a) with DLC coating

図 4-3 DLC 成膜前後の XPS スペクトル

表 4-2 ePTFE に成膜した DLC 最表面の各結合成分比率

Sample	XPS C1s [atm.%]				
	C-C sp <sup>2</sup>	C-C sp <sup>3</sup>	C-O	C=O	O=C-O
DLC/ePTFE	76.4	15.8	3.7	3.7	0.3

#### (4) 濡れ性評価

DLC 成膜前後の最表面組成変化より、濡れ性も変わっている可能性がある。そこで、前章同様、測定液に純水 ( $\text{H}_2\text{O}$ ) を用いた静的接触角測定を行った。その接触角測定は、室温において、 $\theta/2$  法にて  $n=3$  で評価した。なお、測定液は DLC 表面に  $2\mu\text{L}$  滴下した。結果を表 4-3 に示す。また比較用に、延伸されていない PTFE 基板に成膜した DLC 膜の純水接触角も示す。なお、PTFE 上に成膜した DLC 膜の表面粗さは約  $183\text{nm}$  であった。

表 4-3 DLC 成膜前後の純水接触角

Sample	Contact angle [deg]
ePTFE	$132 \pm 1.7$
DLC coated ePTFE	$131 \pm 0.9$
PTFE	$104 \pm 9.7$
DLC coated PTFE	$88 \pm 1.6$

DLC 成膜前後の ePTFE の純水接触角は、有意な差が見られなかった。一方、延伸されていない PTFE 基板では、DLC 成膜後におよそ  $20^\circ$  親水化することを確認した。一般的に濡れ性は、材料の表面自由エネルギーと下地構造に依存することが報告されている<sup>[9-10]</sup>。前述の XPS 分析では、DLC 成膜後に非極性成分である C-F 結合が大幅に減少していることから、DLC 成膜後の基材の表面自由エネルギーは向上しているものと考えられる。そのため、PTFE 基板において、DLC 成膜後に親水化するのは妥当な結果と考えられる。一方、ePTFE は DLC 成膜後も高い純水接触角を維持している。これは、表面自由エネルギーよりも下地構造が強く影響しており、液体の濡れ広がりを阻止するピン止め効果や、Cassie-Baxter 理論に基づく接触面積低下効果などにより、見かけ上の接触角に変化が現れていないためと考えられる<sup>[9-10]</sup>。

## (5) *in-vitro* 細胞培養試験

*in-vitro* 試験による細胞培養試験では、前章同様に、マウス由来の繊維芽細胞 (NIH-3T3) を用いた。細胞培養条件を表 4-4 に示す。また、殺菌処理として、各 DLC サンプル表面に 253.7nm の紫外線を 1 時間照射した。

表 4-4 細胞培養条件

Cell	Mouse fibroblast (NIH-3T3)
Seeding density	$2 \times 10^4$ cells/cm <sup>2</sup>
Medium	D-MEM containing 10% fetal bovine serum
CO <sub>2</sub> concentration	5.0%
Temperature	37.0°C
Incubation time	96 h
pH	6.8–7.2

本実験では、24 穴の培養プレートウェル(Falcon 353047、Becton、Dickinson and Co.、New Jersey、USA)内に、DLC サンプル (10mm×10mm) をカットしてそれぞれ配置した。

96 時間の培養後、血球計算板(Neubauer hemocytometer: Model A116、Sun Lead Glass Co. Ltd.、Tokyo、Japan) と光学顕微鏡 (Model 301-135.001、Leica Co. Ltd.、Tokyo Japan) を用いて、各試料表面上に付着している細胞数を計数した。そして、前章同様、各サンプル間の細胞数の有意差を t 検定にて確認した。

また、96 時間培養された DLC サンプルを凍結保存処理し、その表面に付着している細胞の形態を走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Microscope) により観察した。結果を図 4-4、4-5 に示す。

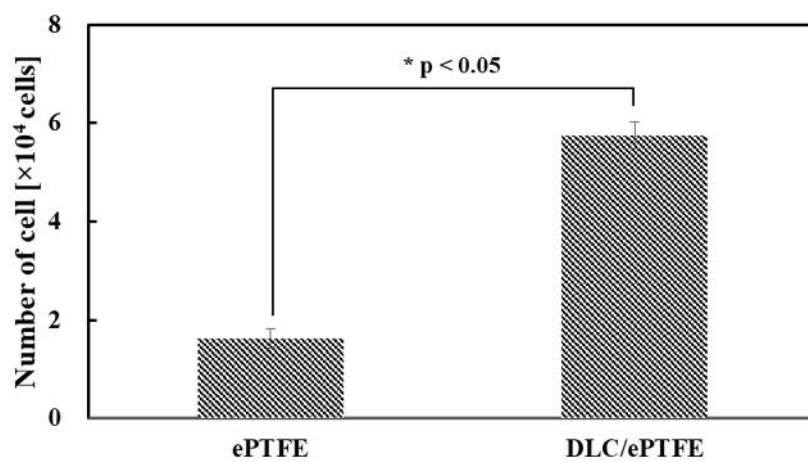
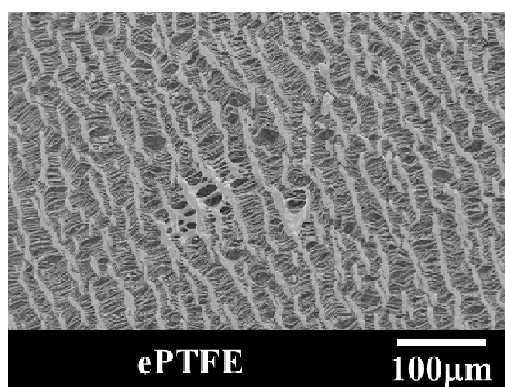
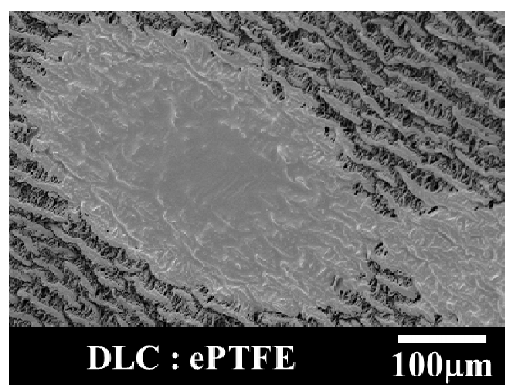


図 4-4 ePTFE に対する DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖促進効果



(b)without DLC coating



(a)with DLC coating

図 4-5 96 時間後の SEM 画像

細胞培養試験の結果、DLC 膜を成膜していない ePTFE は初日に撒いた細胞量と同等程度であり、NIH-3T3 に対する細胞増殖性が低いことが示された。また、SEM 画像からも、DLC 膜を成膜していない ePTFE の表面には、NIH-3T3 細胞が付着している様子は見られなかった。

一方、DLC 膜が成膜された ePTFE は、未成膜対比、約 3 倍の NIH-3T3 細胞増殖促進効果が得られた ( $p<0.05$ )。また、SEM 画像からも、NIH-3T3 細胞が広い範囲で付着している様子が見られた。更に、NIH-3T3 細胞の増殖は、ePTFE の中で比較的径の太い繊維の伸長方向に沿って広がっている傾向が確認された。一般的に DLC 膜上の細胞増殖は表面粗さに影響することが報告されている<sup>[2-3]</sup>。そのため、NIH-3T3 細胞が増殖しやすい繊維径が存在しており、その適切な繊維径に沿って細胞が増殖しているものと考えられる。つまり、ePTFE 繊維径に影響する DLC 膜の膜厚も NIH-3T3 細胞増殖性の制御因子になる可能性がある。

DLC 成膜前後で ePTFE 最表面組成に顕著な違いが見られていることから、この組成変化が NIH-3T3 細胞増殖性に強く関与しているものと考えられる。特に、DLC 成膜後に非極性成分である C-F ピークが顕著に低下し、C=O ピークが顕著に出現していることから、DLC 成膜後に表面自由エネルギーやゼータ電位が向上しているものと考えられる<sup>[11-12]</sup>。その電気化学的な特性変化によって、ePTFE の NIH-3T3 細胞増殖性が改善されたものと考えられる。

以上の結果より、繊維状多孔質素材である ePTFE 人工血管の細胞増殖性を改善するための表面改質手段として、DLC 膜コーティングが有効であることを証明した。

## § 4-3.ePTFE 人工血管に成膜した DLC 膜の光学定数

### (1) DLC 成膜条件

本項では母材の繊維状構造が DLC 膜の光学定数に与える影響を確認するために、ePTFE 上に成膜した DLC 膜の SE 分析を行った。

DLC サンプルは、高周波プラズマ CVD プロセスを用い、平行平板電極において ePTFE 基板 (10mm×10mm) 上に DLC 膜を成膜した (表 4-5)。また、比較対象として Si 基板 (10mm×10mm) 上にも DLC 膜を同条件で成膜した。

表 4-5 DLC 成膜条件

r.f. power [W]	200
Frequency [MHz]	13.56
Source gas	CH <sub>4</sub>
Gas pressure [Pa]	50
Deposition time [min]	13
Gas flow rate [sccm]	37

### (2) SE 分析

前章同様、SE 分析(UVISEL PIUS 1012, HORIBA, Ltd., Japan)において、各 DLC サンプルの光学定数を評価する。SE 分析条件は、前章同様、入射角を 70° に固定した SE 装置において、s 偏光と p 偏光の反射振幅比角 ( $\psi$ ) と位相差 ( $\Delta$ ) を測定した。なお、スポットサイズは 1mm×3mm の楕円形状とした。そして、 $\psi$  と  $\Delta$  の実測スペクトルを基に、平均二乗誤差 ( $\chi^2$ ) が小さくなるよう、DLC 膜層／下地構造を想定した仮想の薄膜多層モデルによる回帰分析を実施した<sup>[13]</sup>。Si 基板上に成膜した DLC 膜の解析モデルは Tauc-Lorentz 分散式を用いた。なお、測定波長は 191～2066 nm (光子エネルギー 0.6～6.5eV) の範囲とした。一方、ePTFE 上に成膜した DLC 膜については、Tauc-Lorentz 分散式で



は適切にフィッティングが出来なかったため、DLC 膜と Void の有効媒質近似 (Effective Medium Approximation) モデルを用いてフィッティングを行った。なお、測定波長は偏光の検出強度が十分に得られた 207～827 nm (光子エネルギー 1.5～6 eV) の範囲とした。

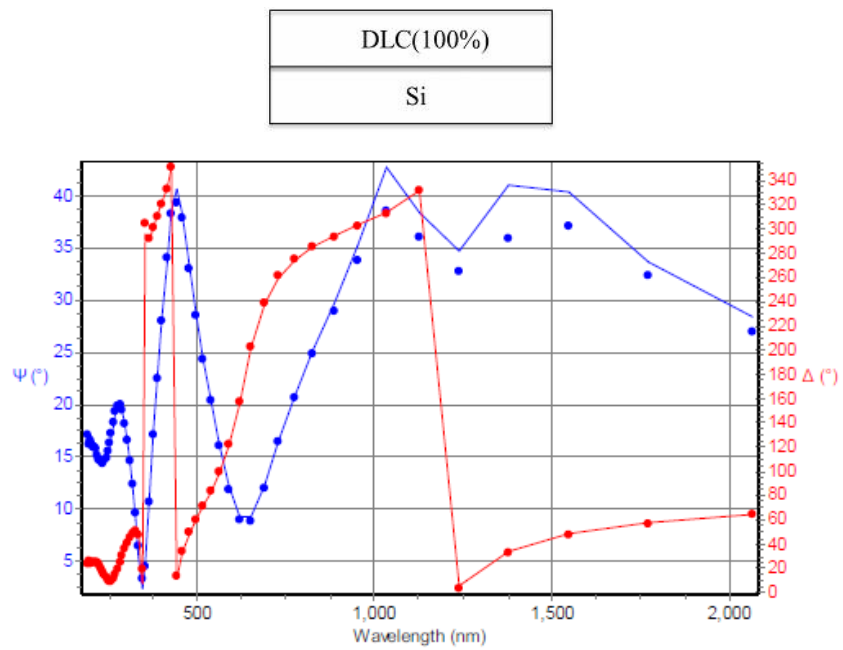
図 4-6 に ePTFE 上に成膜した  $\psi$  と  $\Delta$  のスペクトルと、Si 基板上に成膜した  $\psi$  と  $\Delta$  のスペクトルを示す。なお、プロットが実測スペクトル、実線がフィッティングスペクトルである。また、表 4-6 に SE 分析により同定した各 DLC サンプルの光学定数 ( $\lambda=550\text{nm}$ )、膜厚、 $\chi^2$  を示す。

表 4-6 SE 分析結果

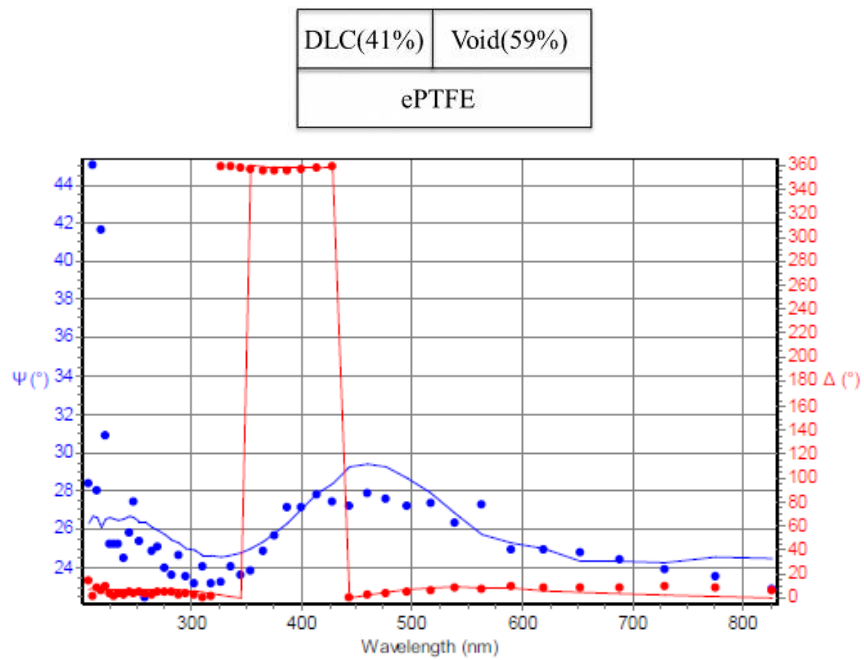
Sample	DLC type	$\chi^2$	film thickness [nm]	n	k
				$\lambda=550\text{nm}$	
DLC/Si	PLC	2.35	210	1.80	0.03
DLC/ePTFE	PLC	25.3	238	1.31	0.01

結果として、いずれの基板においても DLC タイプは PLC となったが、ePTFE 上に成膜した  $\psi$  と  $\Delta$  のスペクトルと、Si 基板上に成膜した  $\psi$  と  $\Delta$  のスペクトルは明らかな違いが見られた。そして、同成膜条件にも関わらず、ePTFE 上に成膜した DLC 膜の光学定数は、Si 基板上に成膜した DLC 膜の光学定数よりも低い値となった。これは、本実験で使用している分光エリプソメトリーの測定スポット径が 1mm×3mm の楕円形状であることから、ePTFE の単一繊維ではなく、複数の繊維が入り組んだ void を含む領域を測定しているためと推測する。このスポット径の影響により、ePTFE に存在している無数の空孔や光散乱の影響を受けて見かけの光学定数が低下しているものと考えられる。従って、本実験で用いた分光エリプソメトリー分析装置において、ePTFE 人工血管のような繊維状多孔質素材に成膜した DLC 膜と平面基板上に成膜した DLC 膜を単純比較

することは困難と考えられる。しかしながら、見かけの屈折率と消衰係数が低く出るものの、繊維状多孔質構造物に成膜した DLC 膜の間でそれら光学定数を相対的に比較できる可能性はある。今後、より微小範囲が測定できるエリプソメトリー分析装置を用いて、単一繊維に着膜した DLC の光学定数を確認する必要がある。



(b) Si 基板上に成膜した DLC 膜



(a) ePTFE 上に成膜した DLC 膜

図 4-6  $\psi$  と  $\Delta$  の SE スペクトル

#### § 4-4.本章のまとめ

本章では、ePTFE 人工血管内壁に成膜した DLC 膜を対象に、その繊維状構造物に対する DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖促進効果を検証すると共に、その NIH-3T3 細胞増殖性と最表面特性、光学定数の関係性について調査した。結果を以下に列記する。

- ① ePTFE に対する DLC 成膜前後で、個々の繊維径が数ミクロン程度増径し、C1s と O1s ピークが顕著に検出されていることから、ePTFE に対して DLC 膜が被覆されていることを示唆した。また、DLC 成膜後の ePTFE の濡れ性は、母材構造の影響を強く受けてしまい、見かけの濡れ性に有意な差が現れないことを明らかにした。
- ② また、ePTFE に対して DLC 膜を成膜することで、NIH-3T3 細胞増殖性が大幅に改善することを確認した。つまり、DLC 膜は ePTFE のような繊維状多孔質素材に対しても、NIH-3T3 細胞増殖性を促進するための有効な表面改質手段になることを証明した。
- ③ 一方、ePTFE 上に成膜した DLC 膜の光学定数は、ePTFE に存在する無秩序な無数の空孔や光散乱等の影響を受けて、見かけの屈折率と消衰係数が低く出ることが判明した。そのため、ePTFE 人工血管のような繊維状多孔質素材に成膜した DLC 膜に対しては最表面組成（C=O 結合比率）を光学的評価指標に用いることが有効と考えられる。

## 参考文献

- [1] 伴 雅人、「DLC 薄膜成膜による微細凹凸構造の形成と細胞挙動」、日本工業大学 第 47 巻 第 4 号 (平成 30 年 2 月)
- [2] Masahito Bana et.al.、「Effects of diamond-like carbon thin film and wrinkle microstructure on cell proliferation」Diamond and Related Materials 90 (2018) 194-201.
- [3] Krzysztof Czyż et.al.、「Selected laser methods for surface structuring of biocompatible diamond-like carbon layers」Diamond and Related Materials 67(2016) 26-40.
- [4]一般社団法人日本人工臓器学会 HP「人工血管」
- [5] 松本 雅彦、「小口径人工血管表面 への白血球，血小板粘着」Arch. Jpn. Chir. 57(5), 351～359, Sept., 1988
- [6] H. Matsuo, K. Kanasugi et.al.、「Biocompatibility of a-C:H film coating for synthetic vascular graft」Diamond and Related Materials Vol. 18 No. 5-8, 1031-1034, 2009.
- [7] Y. Ohgoe, K. Kanasugi et.al.、「Amorphous hydrogenated carbon (a-C:H) film coating on an inner-wall of cylindrical textile materials by r.f. plasma CVD」Diamond & Related Materials 17 (2008) 1702–1705
- [8] Y.Ohgoe et.al.、「Diamondlike carbon film deposition on a polycarbonate-tube inner wall using a cylindrical electrode with radio frequency glow discharge plasma」、J. Appl. Phys. 97, 024906 (2005)
- [9] 三刀 基郷 著、「接着の基礎と理論」日刊工業新聞社 (2012)
- [10] 辻井 薫 著、「超撥水と超親水」米田出版 (2009)
- [11] K. Kanasugi et.al.、「Cytocompatibility of modified a-C:H film deposited on complicated polymeric medical apparatus」Journal of applied physics Vol. 105 No. 9, 094702 1-5, 2009.

- [12] Y. Nitta, K. Okamoto, T. Nakatani, H. Hoshi, A. Homma, E. Tatsumi, Y. Taenaka, Diamond-like carbon thin film with controlled zeta potential for medical material application, *Diamond & Related Materials* 17 (2008) 1972–1976
- [13] M. Hiratsuka et.al., 「Correlation between Optical Properties and Hardness of Diamond-Like Carbon Films」, *Journal of Solid Mechanics and Materials Engineering*, Vol. 7, No. 2, 2013, 187-198

## 5 章 総論

本研究では、細胞接触型医療デバイスの細胞増殖性向上を目指した DLC コーティングの光学的評価指標導出に向けて、DLC 標準化事業で注目されている分光エリプソメトリー分析（光学定数）と比較的汎用的な最表面分析手段である X 線光電子分光分析（最表面組成）に着目し、異なる成膜法で作製した種々の DLC 膜の光学定数と最表面状態、NIH-3T3 細胞増殖性の相互関係の解明と、その DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖メカニズムに基づく光学的評価指標の導出を図った。以下に、本研究で得られた成果について記述する。

第 1 章では、本研究で扱う DLC について言及し、あわせて本論文の背景および目的、意義、構成を述べた。

第 2 章では、本論文の核となる基礎研究として、異なる CVD/PVD 成膜法で作製した 9 種類の DLC サンプルを準備し、種々の DLC 膜の光学定数と最表面状態、NIH-3T3 細胞増殖性の関係解明を試みた。結果として、本実験で作製した DLC サンプルは、屈折率と消衰係数に応じて a-C、GLC、a-C:H、PLC の 4 種類の DLC 膜タイプに区別された。そして、相対的に低い消衰係数と C=O 結合比率となる a-C:H や PLC よりも、相対的に高い消衰係数と C=O 結合比率となる a-C や GLC の方が、NIH-3T3 細胞増殖性が促進することを見出した。つまり、DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖性は、DLC 膜の  $sp^2$  混成軌道結合に依存する消衰係数ならびに酸素官能基量を制御することが非常に重要であり、それら制御因子が NIH-3T3 細胞増殖性に対する光学的評価指標として有用であると結論付けた。以上のように、これまで未知とされていた DLC 膜の光学定数と最表面状態、NIH-3T3 細胞増殖性の相互関係を解明したことは、医工学分野において学術的に大変価値がある。また、本知見は、産業界での DLC 膜設計の最適化や開発期間の短縮化、品質管理強化等に貢献できるものと考えられる。

第 3 章と第 4 章は、応用研究となっており、第 2 章で導出した光学的評価指

標の適用範囲を見極めるために、表面後処理と下地構造の影響について調査している。第 3 章では、DLC の高機能化及び滅菌手段として広く採用されているプラズマ後処理に着目し、人工心臓用血液ポンプ上に成膜した DLC 膜を対象に、光学的評価指標 (C=O 結合比率) に基づくプラズマ後処理効果について述べた。その中で、プラズマ後処理を施した DLC 膜の光学定数と最表面特性、NIH-3T3 細胞増殖性の関係性についても言及した。その結果、DLC 膜に対して Ar または O<sub>2</sub> プラズマ後処理を施すことで、C=O 結合比率を含む酸素結合量の増加と、表面自由エネルギーの向上 (親液化) を引き起こし、NIH-3T3 細胞増殖性が促進することを明らかにした。つまり、第 2 章で提言した光学的評価指標の 1 つである DLC 膜の C=O 結合比率に基づいてプラズマ後処理を施すことで NIH-3T3 細胞増殖性が制御できることを証明した。一方で、DLC 膜の光学定数は、プラズマ後処理を施しても有意な変化は見られないことから、DLC 膜に対する表面後処理の有無により、消衰係数と C=O 結合比率の関係が成立しなくなる場合があることを明らかにした。以上を踏まえ、プラズマ後処理を施した DLC 膜については、C=O 結合比率を NIH-3T3 細胞増殖性の光学的評価指標として用いることが有用になることを示唆した。更に、本知見を踏まえ、光学定数に基づいて DLC 膜の生体適合性に関する標準化を進める上で、表面後処理の基準化または体系化が必須であることを提言した。

プラズマ後処理は DLC 膜の高機能化や滅菌手段として、様々な目的で応用される中、DLC 膜構造に依存する光学定数に変化が見られなかったことは、バルク特性と表面特性の機能分離設計の観点から極めて興味深い知見である。今後、プラズマ後処理以外の表面後処理についても追加検証する必要があるが、それら後処理手段や条件最適化により、DLC 膜の最表面の状態をより精密制御できるようになれば、DLC 膜の更なる高機能化に繋がる可能性がある。その結果、産業界における DLC 膜の利用価値が飛躍的に拡大するものと考えられる。

第 4 章では、ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) 人工血管内壁に成膜し



た DLC 膜を対象に、その繊維状構造物に対する DLC 膜の NIH-3T3 細胞増殖促進効果を検証すると共に、その NIH-3T3 細胞増殖性と最表面特性、光学定数の関係性について言及した。結果として、ePTFE 素材に DLC 膜を成膜することで、その特徴である繊維状多孔質構造は維持した状態で個々の繊維径が数ミクロン程度増径し、C1s と O1s ピークが顕著に検出されていることから、ePTFE に対して DLC 膜が被覆されていることを示唆した。また、DLC 成膜後の ePTFE の濡れ性は、母材構造の影響を強く受けてしまい、有意な差が見られないことを言及した。更に、ePTFE に対して DLC 膜を成膜することで、NIH-3T3 細胞の増殖性が大幅に改善されることから、DLC 膜は ePTFE のような繊維状多孔質素材に対しても、NIH-3T3 細胞増殖性を促進するための有効な表面改質手段になることを実証した。また、NIH-3T3 細胞の増殖は、ePTFE の中で比較的径の太い繊維の伸長方向に沿って特異的に増殖している傾向が確認された。ePTFE 人工血管に対して DLC 膜を適用するためには、機械耐久性や血液適合性などに対する検証も今後必須となるが、これら繊維状多孔質素材に対する細胞の挙動や濡れ性を把握したことは、学術的な観点からは非常に価値があるものと考えられる。一方で、ePTFE 上に成膜した DLC 膜の光学定数は、ePTFE に存在する無秩序な無数の空孔や光散乱等の影響を受けて、見かけの屈折率と消衰係数が低く出ることを明らかにした。そのため、ePTFE 人工血管のような繊維状多孔質素材に成膜した DLC 膜に対しては C=O 結合比率を光学的評価指標に用いることが有効と考えられる。

以上、本研究の成果は、経産省の委託を受けて推進している DLC 標準化事業において、その目的の 1 つに挙げられている「DLC 膜の生体適合性評価法の ISO 規格原案作成」に今後必要となる新たな知見である。また、種々の DLC 膜の消衰係数と最表面の酸化状態の関連性を見出したことで、バイオメディカル分野のみならず、最表面が関与する様々な工学分野においても、n-k 法が活用できる可能性がある。更に、本研究で導出した光学的評価指標に基づいて、産

業界における一般ユーザーが、ミスマッチすること無く、正しい理解の下、ユーザー自身で細胞接触型医療デバイスの細胞増殖性向上を目的にした DLC タイプを容易に選択、検査できるようになることは大変有意義である。そして、DLC の持つ優れた諸特性により、医療デバイスの性能が飛躍的に向上し、医療の発展や患者様の Quality of Life の向上に大きく貢献できるものと考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、多くの方より、御助言、御指導頂きました。ここに深い敬意と感謝の意を表すと共に心より感謝申し上げます。

東京電機大学工学部電気電子工学科 平栗健二 教授には、社会人研究生として受け入れて頂き、指導教員として本研究に関する御指導を賜りました。ここに深く敬意を表すると共に心から御礼申し上げます。また、本論文を作成するにあたり、東京電機大学工学部電気電子工学科 植野彰規 教授、佐藤慶介 教授、森山悟士 准教授、東京電機大学理工学部理工学科 村松和明 教授には、大変貴重な御意見、御検討を頂き、厚く御礼申し上げます。

東京電機大学理工学部理工学科 大越康晴 准教授には、本研究に関する多大なご指導と御助言を頂きました。心より御礼申し上げます。

株式会社堀場製作所 和才容子氏には、分光エリプソメトリー分析に関するご助言を頂きました。心より御礼申し上げます。

最後に、本研究活動を長年にわたり支援して頂きました家族に心より感謝を申し上げます。