

2221 イオンビーム照射による PTFE の表面改質と細胞接着性

Modification and cell attachment on PTFE surface by ion beam irradiation

○喜多村 茜・東大院工

Akane KITAMURA, The University of Tokyo, 2-11-16, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo

小林知洋・理研

鈴木晶大・東大院工

寺井 隆幸・東大院工

Tomohiro KOBAYASHI, RIKEN

Akihiro SUZUKI, The University of Tokyo

Takayuki TERAU, The University of Tokyo

Key Words: <ion beam, PTFE, modification, cell attachment>

1. 研究背景及び目的

現在の医療では、我々の組織や臓器が医薬で治せないほど大きく損傷を受けた場合、一般的に人工臓器や臓器移植が行われる。しかしこれらは完全な技術ではないため、組織の再生や再構築によって相補う再生医療技術の発展が求められている。この組織再生には細胞の足場材料や三次元組織培養基材が必要不可欠であり、多様な研究が進められている⁽¹⁾。その一つに、三次元培養基材からの細胞の脱着を容易にするため、ポリマー表面を数 nm～数 μm の凹凸構造にする方法がある⁽²⁾。PTFE (polytetrafluoroethylene) へのイオンビーム照射でも、微細加工ができ、直径 $1\mu\text{m}$ 弱の孔や数十 μm 間隔の凹凸、あるいは数十 μm 長の突起といった構造を成形できる⁽³⁾。さらに化学的安定性により生体反応も低く、延伸加工により多孔質にした ePTFE (expanded polytetrafluoroethylene) はすでに人工血管^{(8), (9)}等の生体材料として使用され、イオンビーム照射によって細胞接着性の取得も見出されている⁽⁴⁾。以上のことから、イオンビーム照射により表面を微細構造にした PTFE も、三次元組織培養基材としての利用が期待できる。本研究では、イオンビーム照射により PTFE 表面に微細構造を作製し、細胞接着性評価に必要な表面物性解析および細胞接着性について検討した。

2. 実験方法

2-1 イオン注入実験

基材には市販の PTFE シート(厚さ 0.5mm、ニチアス製)を使用し、(独)理化学研究所 TK-100 イオン注入装置によりイオンビーム照射を行った。照射条件は、 N_2^+ イオンを加速エネルギー 80keV、電流密度 $10\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 、照射量 $1\times 10^{15}\sim 1\times 10^{17}\text{ions}/\text{cm}^2$ の条件にて行った。また照射面積は 9cm^2 ($3\text{cm}\times 3\text{cm}$)、イオン注入中の真空度は 1×10^{-5} Torr 程度であった。照射表面については、走査型電子顕微鏡(SEM)による観察を行い、表面特性として濡れ性と表面官能基を調べるため、水との接触角測定および全反射フーリエ変換赤外線分光(ATR/FT-IR)測定を行った。

2-2 細胞接着実験

細胞培養ディッシュ(FALCON 製 3004、材質:ポリスチレン)に $1\text{cm}\times 1\text{cm}$ に切断した試料を置き、マウス由来線維芽細胞(L929)を $2\times 10^5\text{cells}/\text{dish}$ の密度で播種した。培地には RPMI1640 にウシ胎児血清を 10%加えたものを使用し、インキュベータ(ASTECC 製:5% CO_2 雰囲気、 36.5°C)内で、3 日、7 日、11 日間培養した。培養後は試料上の細胞を固定・乾燥させ、SEM で観察し、増殖・伸展の状態を観察した。

3. 結果

3-1 イオン注入による PTFE の表面改質

3-1-1 表面形状

Fig. 1 に未照射および照射量 1×10^{15} 、 1×10^{16} 、 $1\times 10^{17}\text{ions}/\text{cm}^2$ における PTFE の表面形状を示す。照射量 $1\times 10^{15}\text{ions}/\text{cm}^2$ 程度で直径 $1\mu\text{m}$ 弱、深さ $10\mu\text{m}$ ほどの孔が形成され表面が茶色く色付いた。 $1\times 10^{16}\text{ions}/\text{cm}^2$ 程度照射すると孔が増加・拡大して未スパッタ部分が柱状に残り、表面はやや薄い茶色であった。照射量が $1\times 10^{17}\text{ions}/\text{cm}^2$ に至ると照射面は長さ $40\mu\text{m}$ から $100\mu\text{m}$ の突起に覆われ、変色は見られなかった。以後これら一連の表面の形状変化を未照射→細孔状($1\times 10^{15}\text{ions}/\text{cm}^2$)→柱状($1\times 10^{16}\text{ions}/\text{cm}^2$)→突起状($1\times 10^{17}\text{ions}/\text{cm}^2$)と表記する。

3-1-2 表面の濡れ性

表面の濡れ性は、細胞接着に影響を与えることが知られている。そこで、各形状について水の接触角(接触角計:協和界面科学株式会社製 CA-X 型 FAMAS、液滴法:直径 1.8mm、 $3.1\mu\text{l}$ の蒸留水を使用)によって測定した。結果を Fig. 2 に示す。未照射状態から細孔状($\sim 1\times 10^{15}\text{ions}/\text{cm}^2$)にかけて接触角は約 90° に低下するが、柱状から突起状($\sim 1\times 10^{17}\text{ions}/\text{cm}^2$)へ照射量が増加するにつれて 150° 以上に増加した。

3-1-3 表面官能基

表面官能基は、細胞接着や表面の濡れ性に影響を及ぼすため、ATR/FT-IR 測定(Nicolet 製 NEXUS470FT-IR)を行った。結果を Fig. 3 に示す。細孔状から柱状(Fig. 3 b, c, d)にかけて PTFE 固有の $-\text{CF}_2-$ (1205cm^{-1}) 及び $-\text{CF}_3$ (1150cm^{-1}) が減少し、 $-\text{C}=\text{C}-$ (1645cm^{-1})、 $\text{C}=\text{O}$ (1720cm^{-1})、 $-\text{CH}_2-$ ($2936\text{--}2916\text{cm}^{-1}$ 、 1475cm^{-1})、 $\text{C}-\text{OH}$ ($3600\text{--}3200\text{cm}^{-1}$) が出現・増加した。そして突起状(Fig. 3 e, f)に至ると出現した4つの官能基や結合は減少・消滅し、再び $-\text{CF}_2-$ と $-\text{CF}_3$ が増加して未照射状態と類似の結果が得られた。ただし、測定時に光学結晶子の先端を対象試料に押し付けた際、突起状表面の場合は突起がつぶれる。それゆえ、突起先端と側面を含めた突起全体の結果と考える。

3-2 細胞接着性実験

主に突起状表面の試料の場合、11 日間培養後の細胞固定時に PBS(リン酸緩衝生理食塩水)での洗浄中に浮遊する細胞の塊を複数目視できた。作業はクリーンベンチ内で行っているため、大気中の不純物ではなくシャーレ内で伸展した細胞の一部と考えられる。結果を Fig. 4 に示す。未照射表面上では培養期間に因らず細胞の接着・伸展はほとんど確認されなかった。しか

レイオンビームを照射した表面上では、細胞は接着・伸展し、培養期間が長くなるほど粘着する数が増加した様子が観察された。まず培養 3 日目では、細孔状および柱状表面で細胞は平たく広がった状態に変形し、突起状表面では突起の先端部分を渡るように偽足を伸ばした状態で接着していた。そして培養 7 日目では接着した細胞の数はより増加し、培養 11 日目になると、さらに増加した細胞は、個々の細胞の境界がなくなり、基材一面をシート状になって覆っていた。ただし無秩序に、亀裂や剥離部分があり、その数は細孔状、柱状、突起状の順で多く見られた。

4. 考察

4-1 イオン注入による PTFE の表面改質

イオン照射量の増加 ($1 \times 10^{15} \sim 1 \times 10^{17}$ ions/cm²) に伴う形状変化は、始めに微細な孔が形成され、これら孔数の増加や孔径の拡大に伴って柱状に残された部分が突起へと変化する。この形状変化および表面の濡れ性と表面官能基の測定から、各形状の表面特性は次のようにまとめられる。まず細孔状表面は、イオンビームによって F 原子が脱離し、炭化する。そのためアモルファス・カーボンが生成されると同時に、F 原子の脱離部分で親水性のある C=O や -OH が生成され、未照射表面よりも接触角は減少する。そして柱状表面は、脱フッ化に伴って親水性の官能基の導入数も増加するものの細孔状よりも平面部分が減少することで形状効果によって再び接触角は増加し、未照射表面と同程度に戻る。そして突起状表面では、官能基は未照射状態とほぼ等しいものの、微細な突起による形状効果が強く影響して、未照射表面よりも接触角が大きな超撥水性を示す。

4-2 細胞接着性実験

PTFE 表面は未照射の状態では細胞の接着・伸展はほとんどしないが、イオンビームを照射すると細胞は接着・伸展し、培養期間が長くなるほど粘着細胞の数は増加して基材表面を覆う面積も拡大する。培養 11 日目に観察されたシート状の細胞の亀裂は SEM 観察用試料作製における脱水作業での乾燥中に生じたものであり、剥離は前述の培養液中に生じた水流の影響であると考えられる。したがって細胞の剥離は細胞付着力と関係があり、剥離が少ないほど基材表面への付着力が高いと言える。また、細胞は基材に対し、細胞全面で基材に接着しているのではなく、焦点接着と呼ばれる極めて限られた領域だけで接していることがわかっている⁽⁵⁾ことから、細孔状、柱状、突起状の順でその接着領域も減少し、この順で基材への細胞付着力は低下すると言える。

5. まとめ

PTFE 表面はイオンビーム照射により微細構造を作製することができ、さらに細胞接着性も付与することができる。特に 1×10^{17} ions/cm² 程度の照射量により表面を突起状にすることで、新たな官能基の導入をほとんど無しに、超撥水性のある細胞培養が可能な表面に改質することができる。この表面上で伸展した細胞は、突起の先端部分に接触している状態であるため容易に剥離できる。したがって突起状 PTFE の表面で細胞を培養すれば、細胞間の生理的機能を維持した状態で回収できるため、三次元培養基材としての利用が期待できる。

文 献

- (1) 筏義人編, “再生医工学, 基板技術の確立と臨床応用をめざして”, pp.3-5, 化学同人 (2001).
- (2) 田畑泰彦編, “再生医療へのブレイクスルー”, pp.139-144, メディカルドゥ (2004).
- (3) Seok-keun Koh, *et al.*, J. Appl. Polym. Sci. **64**, 1913-1921 (1997).
- (4) 鈴木嘉昭, 村上泰, 中尾愛子, 岩木正哉, 貝原真, 神尾正巳, 高分子材料へのイオンビーム照射と人工硬膜への応用

— アイオニクスイオンの化学と技術 — **284**, 47-54 (1999).

(5) 理研パテント情報 September 2004 No.29, (2004).

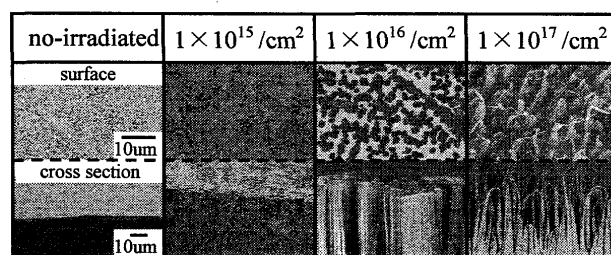


Fig. 1 PTFE surface and cross sectional SEM images of the no-irradiated and irradiated with changing ion doses.

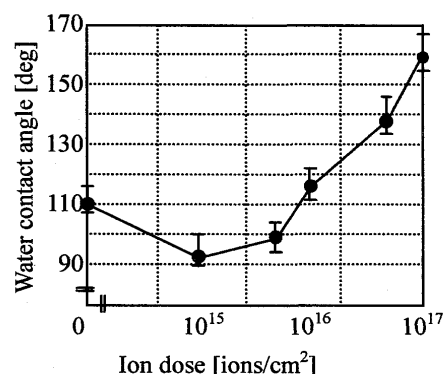


Fig. 2 Water contact angle of the no-irradiated and irradiated PTFE surface with changing ion doses.

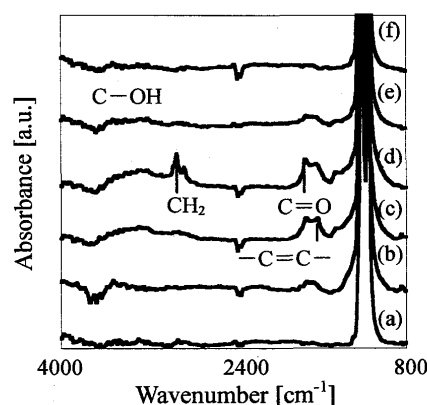


Fig. 3 FT-IR spectra of the PTFE surface with changing ion doses: (a) no-irradiated, (b) 1×10^{15} ions/cm², (c) 5×10^{15} ions/cm², (d) 1×10^{16} ions/cm², (e) 5×10^{16} ions/cm², (f) 1×10^{17} ions/cm².

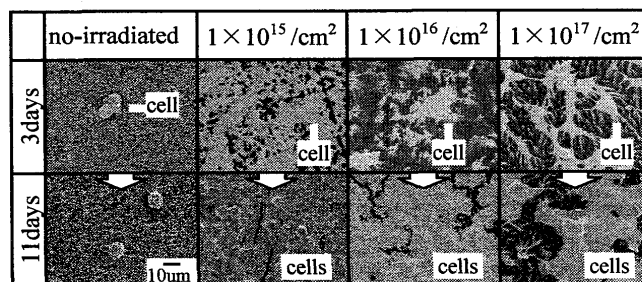


Fig. 4 SEM images of the no-irradiated and irradiated PTFE surface with changing ion doses after 3 days and 11 days incubation.