

東海大学大学院 平成 30 年度博士論文

紫外線励起活性酸素による高分子材料の
表面改質に関する研究

指導 岩森 暁 教授

東海大学大学院総合理工学研究科

総合理工学専攻

細谷 和輝

目次

第 1 章 序論	1
1.1. 表面改質の必要性と各種表面改質技術の特長	2
1.2. 活性酸素の定義と表面改質への応用	4
1.2.1. 活性酸素の定義と種類	4
1.2.2. 紫外線による活性酸素の生成	6
1.2.3. 活性酸素を表面改質技術に応用することのメリットと社会的意義	7
1.3. 本研究の目的	7
1.4. 本論文の構成	8
第 1 章 参考文献	9
第 2 章 電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法を用いた真空環境下における活性酸素検知技術の開発	11
2.1. 第 2 章の研究背景および目的	12
2.1.1. ESR スピントラップ法による活性酸素検出方法	12
2.1.2. 第 2 章の目的	13
2.2. 実験方法・実験条件	13
2.2.1. TEMP 混合 HPMC 膜作製方法	13
2.2.2. 活性酸素曝露方法	15
2.2.3. ESR 測定・評価方法	15
2.2.4. 有意差判定方法	15
2.3. 実験結果および考察	17
2.3.1. TEMP 混合 PVA, HPMC 膜の ESR 吸収強度の違い	17
2.4. 第 2 章のまとめ	22
第 2 章 参考文献	23
第 3 章 紫外線励起活性酸素による汎用性高分子材料の表面改質	24
3.1. 第 3 章の研究背景および目的	25
3.1.1. 汎用性高分子材料について	25
3.1.2. 第 3 章の目的	25
3.2. 実験方法・実験条件	25
3.2.1. 試料準備	25
3.2.2. 活性酸素曝露方法	26
3.2.3. AFM による表面粗さ測定方法	26
3.2.4. 接触角測定方法	26
3.2.5. X 線光電子分光分析方法	26
3.2.6. 有意差判定方法	26

3.3. 実験結果および考察.....	27
3.3.1. 算術平均粗さ (R_a) の変化.....	27
3.3.2. ぬれ性の変化.....	28
3.3.3. XPS スペクトルの変化.....	29
3.3.4. 考察.....	33
3.4. 第3章のまとめ.....	33
第3章 参考文献.....	34
第4章 ポリスチレン表面の改質効果と細胞接着性向上因子の考察.....	35
4.1. 第4章の研究背景および目的.....	36
4.1.1. PS の細胞培養基板としての利用.....	36
4.1.2. 材料の表面特性と細胞接着性の関係.....	36
4.1.3. 細胞接着性向上を目的とした従来の表面改質と活性酸素による表面改質.....	36
4.1.4. 第4章の目的.....	37
4.2. 実験方法・実験条件.....	38
4.2.1. 試料準備.....	38
4.2.2. 活性酸素曝露方法.....	38
4.2.3. 比較対照.....	38
4.2.4. 接針式線粗さ測定装置による表面粗さ測定方法.....	38
4.2.5. 接触角測定方法.....	39
4.2.6. X線光電子分光分析方法.....	39
4.2.7. 紫外線照度測定方法.....	39
4.2.8. 活性酸素濃度測定.....	39
4.2.9. 細胞接着性評価.....	40
4.2.10. 有意差判定方法.....	40
4.3. 実験結果および考察.....	41
4.3.1. 活性酸素による表面改質におよぼす紫外線ランプと PS 製細胞培養基板との距離の影響.....	41
4.3.1.1. 算術平均粗さ (R_a) の変化.....	41
4.3.1.2. 紫外線ランプと PS 基板の距離による表面元素組成の変化.....	42
4.3.1.3. PS 表面の XPS スペクトルの変化と元素分析結果.....	43
4.3.1.4. PS 表面の接触角の変化.....	46
4.3.1.5. 紫外線ランプとの距離による紫外線照度および活性酸素生成量の比較.....	47
4.3.1.6. 紫外線ランプとの距離が表面改質効果に与える影響に関する考察.....	49
4.3.1.7. 細胞培養試験結果.....	49
4.3.1.8. 表面改質効果が細胞接着性に与える影響に関する考察.....	52
4.3.2. 活性酸素種曝露時間が PS 製細胞培養基板の表面改質効果に与える影響.....	53

4.3.2.1.	算術平均粗さ (R_a) の変化	53
4.3.2.2.	表面元素組成の変化	54
4.3.2.3.	XPS スペクトルの変化	55
4.3.2.4.	表面元素組成と接触角の変化	56
4.3.2.5.	角度分解 XPS による深さ方向解析	57
4.3.2.6.	表面特性と細胞接着性の比較	60
4.4.	第 4 章のまとめ	64
	第 4 章 参考文献	65
	第 5 章 ポリジメチルシロキサンの表面改質効果の安定性向上	66
5.1.	第 5 章の研究背景および目的	67
5.1.1.	ポリジメチルシロキサン (PDMS) の細胞培養基板への応用について	67
5.1.2.	PDMS の細胞接着性向上を目的とした表面改質	67
5.1.3.	第 5 章の目的	68
5.2.	実験方法・実験条件	68
5.2.1.	試料準備	68
5.2.2.	活性酸素曝露方法	68
5.2.3.	プラズマ照射方法	68
5.2.4.	白色干渉顕微鏡による表面粗さ測定方法	69
5.2.5.	接触角測定方法	69
5.2.6.	X 線光電子分光分析方法	69
5.2.7.	細胞培養評価方法	69
5.2.8.	有意差判定方法	70
5.3.	実験結果および考察	71
5.3.1.	表面化学状態の変化	71
5.3.2.	算術平均粗さ (S_a) の変化	75
5.3.3.	接触角の変化	76
5.3.4.	表面改質後の経過時間による XPS スペクトルの経時変化	77
5.3.5.	表面改質後の経過時間による接触角の経時変化	81
5.3.6.	細胞培養評価結果	82
5.4.	考察	84
5.5.	第 5 章のまとめ	86
	第 5 章 参考文献	87
	第 6 章 総 括	89
	謝辞	93

第 1 章

序論

1.1. 高分子材料に対する表面改質の必要性和各種表面改質技術の特長

近年の科学技術の発展に伴って、身の回りの製品から医療分野まで、様々な機械製品は、小型化、精密化が進んでいる。それらを構成する材料の中でも高分子材料は、金属材料やセラミックス材料と比較して、軽量である、成形性に優れる、熱、電気絶縁性に優れるといった特長から、機械製品を構成する材料として欠かせないものである。一方、金属材料に比べ機械強度や耐熱性が劣ることから、1つの機械製品を高分子材料だけで構成することは難しく、多くの場合金属材料やセラミックス材料など高分子材料以外の材料と接着して構成されている。また、医療分野や生物研究分野で用いられる高分子材料は、金属材料やセラミックス材料に代わり体内埋入材料や、ディスプレイ製品として、細胞や生体組織、体液と接する環境で使用されている。硬組織、軟組織適合性、細胞接着性、抗血栓性など、用途、使用される環境により、求められる特性が異なる。上記のように、高分子材料は分野問わず様々な場面で使用されているが、多くの場合異種表面と接する環境で使用されている。しかしながら、高分子材料は表面自由エネルギーが小さいことが特徴として挙げられる。したがって、用途、使用される環境に合わせて高分子材料表面の化学的特性や、ぬれ性、粗さといった、表面特性を適切に制御することにより、異種表面との接着性の向上や、各種生体適合性の向上が図られている。また、離型剤や低分子量のポリマー、炭化水素汚染物など、高分子材料表面には様々な物質が付着しており、それらの分解、除去といったクリーニング効果も期待できる⁽¹⁾⁻⁽³⁾。

表面改質とは、材料表面の特性を何らかの手法で変化させることにより、材料の機能の改善や、新たな特性を付与する技術である。材料表面のみを変化させるため、材料の機械的特性を維持しながら新たな特性を付与することができる。今日までに、以下のような様々な表面改質技術が利用されている。

1) 粗面化

ブラスト照射や物理研磨、エンボス加工などの手法によって表面粗さを制御する手法である。表面粗さの程度により、アンカー効果による接着性の改善やぬれ性の制御や、が期待できる。材料の表面粗さと表面のぬれ性の関係は Wenzel モデルなどが知られている。Wenzel モデルは粗い表面における見せかけの接触角 θ_w 、平滑面に静置した水滴の接触角 θ_e 、水滴と接している固体表面における水平面への投影表面積に対する実表面積の比 r とすると以下のように表すことができる。

$$\cos\theta_w = r\cos\theta_e = r(\gamma_S - \gamma_{SL})/\gamma_L \quad (1-1)$$

γ_S は固体の表面自由エネルギー、 γ_L は液体の表面自由エネルギー、 γ_{SL} は固体/液体界面の表面自由エネルギーである。すなわち、平滑面での接触角が 90° 以上の疎水性表面で

は、粗面化によってぬれにくくなり、平滑面での接触角が 90°以下の親水性表面では、粗面化によってぬれやすくなることを示している。表面粗さの制御によって、接着性の改善やぬれ性の制御が行われる。一方、表面への研磨剤や研磨屑の残存の可能性や、それらを除去するための洗浄プロセスも別途必要である^{(1-1), (1-5)}。

2) プラズマ照射

真空中でガスに電圧を印加してプラズマを発生させ、プラズマ内のイオンや電子の衝突や、ラジカル種や励起ガスといった活性ガスの反応により、表面官能基や表面元素組成や、材料表面の粗さやぬれ性を制御する手法である⁽¹⁻¹⁾⁻⁽¹⁻³⁾。高分子材料を構成する、炭素-炭素結合や炭素-水素結合の切断により、高分子材料表面にラジカルを生成し、水素引き抜きや架橋、活性ガスの反応などによって表面改質が進行する⁽¹⁻⁴⁾。プラズマによる高分子材料の表面改質に関する研究事例として、材料表面への官能基の導入について多くの報告がされている。Guruvenket らはポリスチレンやポリエチレンにアルゴンプラズマまたは酸素プラズマを照射した結果、酸素プラズマ照射後の表面に酸素由来の官能基が形成され、照射時間や出力、ガス種によってぬれ性が変化することを報告している⁽¹⁻⁶⁾。また、Trentin らは窒素と水素の混合ガスを用いて発生させたプラズマによってポリスチレンの表面改質を行った結果、C-N 結合や、N-C=O 結合など窒素由来の官能基の形成が可能であることを報告している⁽¹⁻⁷⁾。以上のような導入ガスの変更に加え、操作圧力、照射時間、印加電力など、各種プラズマ照射条件を変更することにより、表面官能基の種類や密度、接触角や表面粗さなど様々な表面特性の制御が可能である。上記以外にも、プラズマ照射を用いた高分子材料の表面改質効果について数多くの研究報告があり、プラズマ照射は工業的にも高分子材料に対する表面改質として一般的に利用されている⁽¹⁻⁷⁾⁻⁽¹⁻¹¹⁾。例えば、ポリスチレン製細胞培養基板の細胞接着性向上を目的とした表面改質には酸素プラズマ照射が一般的に採用されている⁽¹⁻¹²⁾。一方、一般的にプラズマを発生させるためには、高真空プロセスが必要であり、高真空に耐えうる真空容器や、ディフュージョンポンプやターボ分子ポンプなど高真空用のポンプが必要である。そこで、表面改質処理工程の簡便化やメンテナンスの容易さから、大気圧環境下での処理が望まれている。今日では誘電体バリア放電等によって発生させた大気圧プラズマジェットを用いた表面改質技術が盛んに研究されている^{(1-13), (1-14)}。低温かつ大気圧環境で生成可能であることから、耐熱性のない材料や真空中に入れることができないものに照射することができる。一方、大気圧プラズマジェットは細長い筒状の装置からプラズマが照射されるため、大面積の表面改質には複数のプラズマジェットを束にする、もしくは走査する必要がある⁽¹⁻¹⁵⁾。

3) 溶液による化学的処理

溶剤を用いて化学的に表面を変性するウェットプロセスである。材料表面のエッチ

ングや酸化、還元によって粗面化や表面組成の制御といった効果があり、めっきの密着性向上を目的とした前処理等に利用されている。しかしながら、クロム酸などの酸化性溶液が使用されることが多く、クロム酸水溶液中の 6 価クロムは発がん性であり、酸化力が強いことから、使用環境や廃液処理方法など取り扱いに注意が必要である。また、ウェット環境で行われる表面改質は、表面に残存する溶液除去のため、別途洗浄プロセスが必須である⁽¹⁻¹⁶⁾。

4) 薄膜形成技術

材料表面に別の材料を薄く成膜することも表面改質技術の一つである。化学気相蒸着法や物理気相蒸着法のように、気相中で材料表面に緻密な薄膜を形成する技術や、溶剤に溶かした材料を基板表面に滴下し、基板を高速回転させることによって成膜するスピコート法、溶剤に溶かした材料に基板材料を沈め一定速度で引き上げることによって成膜するディップコート法など様々な手法がある。一方、成膜材料と基板材料同士の密着性が乏しい場合、剥離につながることもあり、密着性向上のために基板材料の表面を直接変化させる表面改質と併用されている。

上記のように、今日までに様々な表面改質技術が利用されているが、高真空プロセスが必要なもの、いくつかの手法を組み合わせる必要があるもの、表面改質を施す材料の形状や性質に制限があるもの等、表面改質プロセスの複雑化や処理コストの増大につながる短所が挙げられる。そこで、低温かつドライな大気圧に近い圧力環境下での処理が可能で、形状に制限を受けにくく、別途洗浄の必要がない表面改質技術を開発することによって、表面改質プロセスの簡便化、低コスト化につながり、工業の発展につながると考える。

1.2. 活性酸素の定義と表面改質への応用

1.2.1. 活性酸素の定義と種類

紫外線励起活性酸素は、酸素分子に特定波長の紫外線を照射することによって生成される反応性の高い酸素種である。Table 1-1 に活性酸素種の一例を示す。酸素原子 $O(^3P)$ や酸素の励起種、オゾン (O_3) などのほかに、酸素原子と水素原子など酸素以外の元素との化合物であるヒドロキシラジカル (OH^*) なども活性酸素の一種である。Table 1-2 に各種活性酸素および基底状態の酸素分子である三重項酸素分子 (3O_2) の有機物との反応速度定数を示す。 OH^* や Δ 状態の励起一重項酸素分子 $O_2(^1\Delta_g)$ は 3O_2 と比較して、どの活性酸素種もけた違いに反応性が高いことがわかる⁽¹⁻¹³⁾。

Table 1-1 活性酸素の種類.

酸素原子のみ		酸素と他の元素の化合物	
$O(^3P)$	酸素原子	HO_2	ヒドロペルオキシド
$O(^1D)$	励起一重項酸素原子	H_2O_2	過酸化水素
$O_2(^1\Delta_g)$	励起一重項酸素分子	OH^*	ヒドロキシラジカル
O_3	オゾン	RO^*	アルコキシラジカル
		ROO^*	ペルオキシラジカル

Table 1-2 活性酸素および基底状態酸素分子の有機物との反応速度定数.

	活性酸素種					
	OH^*	$O_2(^1\Delta_g)$	$O(^3P)$	HO_2	O_3	3O_2
速度定数	10^8-10^9	10^6-10^7	10^5-10^6	10^2-10^3	10^2-10^3	10^{-30}

L/mol/sec

1.2.2. 紫外線による活性酸素の生成

低圧水銀ランプは、水銀原子の共鳴線である波長 185 nm と波長 254 nm の紫外線を発する紫外線ランプである。 $^3\text{O}_2$ は、波長 200 nm 以下に吸収帯を持ち、光化学反応によって $\text{O}(^3P)$ 、 O_3 を生成する。 O_3 は、波長 220 nm~300 nm までに吸収帯を持ち、励起一重項酸素分子 ($\text{O}(^1D)$) と $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ を生成することが知られている。したがって、低圧水銀ランプから発せられる紫外線を $^3\text{O}_2$ 雰囲気照射することによって活性酸素を生成することが可能である。低圧水銀ランプが発する波長 185 nm および 254 nm の紫外線による活性酸素の生成は以下のように進行し、 $^3\text{O}_2$ の光分解反応によって、 $\text{O}(^3P)$ 、 O_3 、 $\text{O}(^1D)$ 、 $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ などが生成される^{(1-18), (1-19)}。



さらに、活性酸素同士が反応し合うことによって、再び $^3\text{O}_2$ が生成される。



式 1-5 から式 1-8 で示すような失活反応によって生成された $^3\text{O}_2$ に対して紫外線が照射されることにより、式 1-2 から式 1-4 で示したような活性酸素生成が再度始まる。したがって、低圧水銀ランプを点灯している限り、活性酸素を連続的に生成し続けることができる。

1.2.3. 活性酸素を表面改質技術に応用することのメリットと社会的意義

活性酸素は低温かつ低真空や大気圧環境下でも酸素と紫外線があれば生成可能であることから、活性酸素を表面改質技術に応用することによって以下のようなメリットが期待できる。

- (1) 低温環境で生成できることから、汎用性高分子材料のような耐熱性の低い材料の表面改質に応用が可能である。
- (2) 低真空または大気圧環境下でも生成可能であることから、高真空用のチャンバーや高真空用のポンプが必要なく、メンテナンスも容易である。
- (3) 活性酸素は失活すると基底状態の酸素分子に戻ることから、活性酸素が材料表面に残存することがなく、表面改質後に洗浄が必要ない。
- (4) ドライな気体であることから耐水性に乏しい材料や複雑な形状の機器の表面改質に応用が期待できる。

以上のメリットから、紫外線励起活性酸素を高分子材料の表面改質技術に応用することにより、これまで表面改質技術の欠点を解決した汎用性の高い新規表面改質技術として期待できる。

1.3. 本研究の目的

本研究では、紫外線励起活性酸素を用いた高分子材料の表面改質技術の確立を目標とした。目標達成の方策として、以下の項目を検討した。

まず、低真空または大気圧環境で生成される活性酸素を検知し、適切な活性酸素曝露条件を検討するために、電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法を応用した空間中の活性酸素検知技術を開発する。

次に、数種の汎用性高分子材料を供試材料とし、活性酸素の表面改質効果を比較する。さらに、得られた知見をもとに汎用性高分子材料の一種であるポリスチレンやシリコーンゴムであるポリジメチルシロキサンを供試材料とし、活性酸素に曝露する条件を変更することによって表面改質効果に与える変化と、形成される改質層の詳細な評価を行う。得られた知見をもとに活性酸素による高分子材料の表面改質の特徴を明らかにする。また、細胞接着性向上を目的とした表面改質に活性酸素を応用し、活性酸素によって制御した表面特性と細胞接着性との比較によって細胞接着性に寄与する表面特性を考察する。

上記の検討項目から得られた知見をまとめ、紫外線励起活性酸素を用いた高分子材料の表面改質技術としての可能性を検討する。

1.4. 本論文の構成

本論文は以下の 6 章で構成される。

第 1 章は緒論であり、研究背景として現行の表面改質技術についてまとめ、それぞれの特徴と、問題点を提起した。活性酸素の特徴と生成メカニズムについて述べ、表面改質として応用することによって得られるメリットをまとめた。その上で本研究の目的を定義した。

第 2 章では電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法を用いて、低真空環境下で活性酸素を検知する手法の開発を行った。活性酸素濃度を高めるために減圧プロセスを経ることを想定し、通常溶媒に溶かして使用されるスピントラップ剤をヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) と混合して乾燥することによって膜化し、活性酸素検知膜を作製した。低真空環境下で生成された活性酸素の検知特性について過去に報告されたポリビニルアルコールと比較し活性酸素検知膜としての有用性を検討した。

第 3 章では側鎖の構造が異なるポリプロピレン (PP)、ポリエチレン (PE)、ポリスチレン (PS) を活性酸素に曝露し、各材料の分子構造に対する表面改質効果を比較した。得られた知見をもとに、高分子材料に対する活性酸素の表面改質メカニズムについて考察した。

第 4 章では第 3 章で得られた知見をもとに最も表面改質効果が表れた PS を供試材料として、活性酸素によって PS 表面に形成される表面改質層を詳細に評価した。PS は医療、生物研究分野においてディスプレイ細胞培養基板材料として広く用いられていることから、細胞接着性向上を目的とした表面改質への応用を目指した。紫外線ランプからの距離や活性酸素曝露時間による表面改質効果の違いを評価し、活性酸素による PS の表面改質メカニズムを考察した。さらに酸素プラズマ照射が施された市販の細胞培養基板 (TCPS) と比較し、活性酸素によって形成される PS の表面改質層の特徴を明らかにした。また、活性酸素によって表面状態を制御した PS に対してマウス頭外環由来骨芽細胞用細胞 (MC3T3-E1) を播種し、細胞接着性を比較することにより、PS の表面状態と細胞接着性の関係と、細胞接着性向上に寄与する表面特性について考察した。

第 5 章では、医療、生物学研究の分野において柔軟な細胞培養基質として使用されるポリジメチルシロキサン (PDMS) を供試材料として、第 3 章、4 章で取り上げた汎用性高分子材料以外の高分子材料に対する表面改質に応用可能か検討した。活性酸素および活性酸素生成時に使用する紫外線を併用した表面改質効果を評価した。また、PDMS は分子構造の柔軟性によって酸素プラズマ照射ではすぐに表面改質効果が失われることが報告されていることから、表面改質効果の経時的な変化を評価し表面改質効果の安定性について評価した。さらに、活性酸素および紫外線の曝露後の PDMS 上で MC3T3-E1 を培養することによって細胞接着性を評価し、ゴム材料の細胞接着性向上を目的とした表面改質に応用可能か検討を行った。

第 6 章では第 2 章～第 5 章までに得られた知見をまとめ、工業的な意義について総

括した。

第1章 参考文献

- (1-1) 日本規格協会, 接着剤-接着強さ試験方法-第3部: プラスチックの表面調整のための指針, JIS K 6848-3, (1999).
- (1-2) 羽田正紀, プラスティックフィルムの表面改質, 日本印刷学会誌, Vol. 47, No. 2 (2010), pp. 8-13.
- (1-3) 柳原榮一, 高分子材料の表面処理, 日本接着学会誌, Vol. 37, No. 2 (2001), pp. 32-40.
- (1-4) 小川俊夫, 高分子の表面改質・解析の新展開, シーエムシー出版, (2007)
- (1-5) 今林信一郎, 固体表面のぬれ性に対する表面粗さの効果, Review of Polarography, Vol. 54, No. 2 (2008), pp. 115-121.
- (1-6) S. Guruvenket, G. Mohan Rao, M. Komath and A. M. Raichur, Plasma surface modification of polystyrene and polyethylene, Applied Surface Science, Vol. 236 (2004), pp. 278-284.
- (1-7) D. S. Trentin, F. Bonatto, K. R. Zimmer, V. B. Ribeiro, A. S. Antunes, A. L. Barth, G. V. Soares, C. Krug, I. J. R. Baumvol and A. J. Macedo, N₂/H₂ plasma surface modifications of polystyrene inhibit the adhesion of multidrug resistant bacteria, Surface & Coatings Technology, Vol. 245 (2014), pp. 84-91.
- (1-8) 朴東旭, 宇山良公, 筏義人, プラズマ処理高分子の継時変化, 高分子論文集, Vol. 48, No. 9 (1991), pp. 529-534.
- (1-9) O. M. Ba, P. Marmey, K. Anselme, A. C. Duncan and A. Ponche, Surface composition XPS analysis of a plasma treated polystyrene: Evolution over long storage periods, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 145 (2016), pp. 1-7.
- (1-10) Y. Chen, Q. Gao, H. Wan, J. Yi, Y. Wei and P. Liu, Surface modification and biocompatible improvement of polystyrene film by Ar, O₂ and Ar + O₂ plasma, Applied Surface Science, Vol. 265 (2013), pp. 452-457.
- (1-11) H. Mirzadeh and S. Bagheri, Comparison of the effect of excimer laser irradiation and RF plasma treatment on polystyrene surface, Radiation Physics and Chemistry, Vol. 76 (2007), pp. 1435-1440.
- (1-12) A. S. Zeiger, B. Hinton and K. J. Van Vliet, Why the dish makes a difference: Quantitative comparison of polystyrene culture surfaces, Acta Biomaterialia, Vol. 9 (2013), pp. 7354-7361.
- (1-13) M. Kwiatkowski, P. Terebun, and T. Murakami, RF-Powered Atmospheric-Pressure Plasma Jet in Surface Treatment of High-Impact Polystyrene, IEEE TRANSACTIONS ON

PLASMA SCIENCE, Vol. 44, No. 3 (2016), pp. 314-320.

- (1-14) D. Shaw, A. West, J. Bredin and E. Wagenaars, Mechanisms behind surface modification of polypropylene film using an atmospheric-pressure plasma jet, *Plasma Sources Science and Technology*, Vol. 25, No. 6 (2016), pp. 1-6.
- (1-15) 田井利弘, 顧 蔚紅, 大前 比登美, ポリアミド/ABS 樹脂のクロム酸エッチングフリーめっき技術の開発, *表面技術*, Vol. 59, No. 5 (2008), pp. 315-318.
- (1-16) 杉光英俊, オゾンの基礎と応用, 光琳, (2004).
- (1-17) R. Atkinson, D. L. Baulch, R. A. Cox, J. N. Crowley, R. F. Hampson, R. G. Hynes, M. E. Jenkin, M. J. Rossi and J. Troe, Evaluated kinetic and photochemical data for atmospheric chemistry: Volume I – gas phase reactions of O_x, HO_x, NO_x and SO_x species, *Atmospheric chemistry and Physics*, Vol. 4 (2004), pp. 1461-1738.
- (1-18) R. Ono, Y. Nakagawa, Y. Tokumitsu, H. Matsumoto, and T. Oda, Effect of humidity on the production of ozone and other radicals by low-pressure mercury lamps, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 274 (2014), pp. 13-19.

第 2 章

電子スピン共鳴 (ESR) スピントラップ法を用いた真空環境下における活性酸素検知技術の開発

2.1. 第2章の研究背景および目的

2.1.1. ESR スピントラップ法による活性酸素検出方法

空間中の活性酸素は O_3 など一部を除いて寿命が短く、直接的に検知することは困難であることから、レーザー誘起蛍光 (Laser Induced Fluorescence) 法など、光学的な手法を用いた検知が行われている^{(2-1), (2-2)}。小野らは、基底状態酸素分子に 226 nm のレーザー光を照射して励起し、励起準位から下準位に遷移する際の波長 845 nm の蛍光を測定することで原子状酸素の数密度を計測している。また低圧水銀ランプによって発生させた励起状態酸素分子 $O_2(^1\Delta_g)$ が基底状態に戻る際に発する波長 1270 nm の燐光を測定することによって $O_2(^1\Delta_g)$ の生成量を測定している⁽²⁻³⁾。しかしながらこれらの手法は、レーザー装置や分光器などが必要であり、高価かつ煩雑な測定プロセスとなる。

松本らは高周波 (R.F.) スパッタリングによってフッ化炭素薄膜を成膜した水晶微小天秤 (QCM) を用いた活性酸素検知技術を報告している^{(2-4), (2-5)}。この手法は光学的手法と比較して小型で簡便であるものの、QCM が高価であることや、直接 QCM の電極が活性酸素に曝露されるため、長期的に使うことができないと考えられる。

一方、ESR スピントラップ法も活性酸素を検出する手法として一般的である。ESR は強磁場中に置いた不対電子を持つ材料に対して照射したマイクロ波の吸収によって材料中の不対電子の状態を解析する手法である。しかしながら、活性酸素のような短寿命のガスの直接的な測定は真空環境や低温環境など限定的な環境以外困難である。そこで短寿命の活性酸素の検知には ESR スピントラップ法が用いられている。スピントラップ剤と呼ばれる電子捕縛剤と短寿命な活性酸素を反応させることによって生成した長寿命ラジカルを ESR で測定することによって、間接的に活性酸素検出する手法である。活性酸素種ごとに反応するスピントラップ剤が報告されており、 $O_2(^1\Delta_g)$ には 2,2,6,6-Tetramethyl-4-Piperidinol (TEMP), OH^{\bullet} には 5-(2,2-Dimethyl-1,3-Propoxycyclophosphoryl)-5-Methyl-1-Pyrroline N-Oxide (CYPMPO) が知られている⁽²⁻⁴⁾⁻⁽²⁻⁶⁾。一方、その多くは液中の活性酸素種を測定する目的で使用されており、気相中の活性酸素種の報告はわずかである。また、減圧プロセスを経る測定環境の場合、スピントラップ剤の溶媒が揮発してしまうため、定量的な評価が困難であるといった問題が挙げられる。

吉野らは上記問題を解決する方法として、TEMP 水溶液を水溶性高分子の一種であるポリビニルアルコール (PVA) 水溶液と混合して乾燥することによってスピントラップ剤混合 PVA 膜を形成し、真空環境下でも使用可能な活性酸素検知膜の作成を試みた。スピントラップ剤混合 PVA 膜を活性酸素に曝露した結果、真空環境下でも活性酸素検知が可能であることを報告している⁽²⁻⁷⁾。しかしながら、PVA は造膜性が高い一方、水溶性高分子の中でも酸素透過性が低いガスバリア性材料として広く知られており、包装材料などに使用される材料である。より酸素透過度の高い水溶性高分子を使用することによって活性酸素検知膜としての性能が向上すると考えられる。

ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) は錠剤コーティングなどに使用さ

れる優れた造膜性を有する水溶性のセルロースである^{(2-8), (2-9)}. PVA の酸素透過係数は $3.9 \times 10^{-3} \text{ m}^3(\text{STP})/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ と低いことに対し, セルロース (酢酸セルロース) は $3.2 \text{ m}^3(\text{STP})/\text{m}^2/\text{s}/\text{Pa}$ と酸素透過度が比較的高い材料であることから, 膜化材料として使用することで PVA と比較して活性酸素検知効率が向上すると考えられる⁽²⁻¹⁰⁾.

2.1.2. 第2章の目的

本章では, 減圧プロセスを経る活性酸素生成装置に機械的に組み込むことなく, 装置庫内の活性酸素検知を可能とする手法として, スピントラップ剤混合水溶性高分子膜に着目し, 膜化材料の違いによる活性酸素検知量を比較した. また, HPMC フィルム内への活性酸素拡散挙動について考察した. 得られた知見をもとに活性酸素検知技術としての有用性を検討した.

2.2. 実験方法・実験条件

2.2.1. TEMP 混合 HPMC 膜作製方法

スピントラップ剤は励起一重項酸素のスピントラップ剤である, TEMP (Sigma-Aldrich Co., LLC., USA) を使用した. TEMP は一重項酸素と反応することによって 1-oxyl-2,2,6,6-tetramethyl-4-hydroxypiperidine (TEMPOL) を生成する. TEMP は純水に 50mM になるように溶解した. HPMC (Thermo Fisher Scientific Chemicals, Inc., USA) は純水に 2.5 wt.% になるように溶解した. また, 比較対照として PVA (PVA-205, Kurarei Co., Ltd., Japan) も同様に純水に 2.5 wt.% になるように溶解した. 直径 55 mm のシャーレ内で水溶性高分子水溶液と TEMP 水溶液をそれぞれ重量比 1 : 1 になるように混合した. その後 40°C の恒温器内で 24 時間乾燥し, 検知膜を作製した. フィルム膜厚はこの時の混合量によって制御し, フィルム内の 3 か所の平均が $3\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ のフィルムを作製した. 試料はプラスチックシャーレごと滅菌バッグで包装した. 滅菌バッグは滅菌処理の時に滅菌対象物を包装する不織布製の袋である. 本研究では不織布とプラスチックフィルムが張り合わされたものを使用した. Fig. 2-1 に不織布とプラスチックフィルムの光線透過率を示す. 活性酸素生成に用いられる 185 nm と 254 nm をはじめとする 300 nm 以下の紫外線を遮断する. また不織布面は活性酸素を透過することから, 不織布内の試料には活性酸素のみ作用する環境を作った.

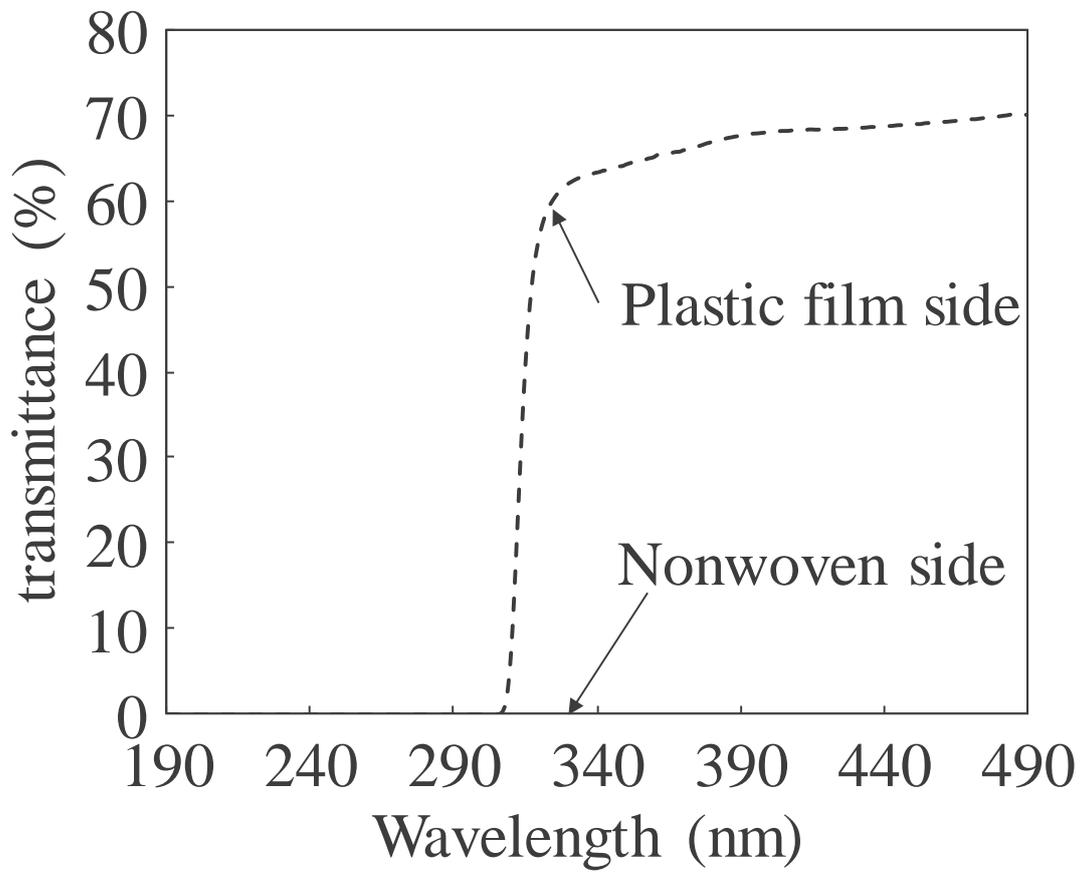


Fig. 2-1 滅菌バッグの光線透過率 (copyright©2018 IEICE).

2.2.2. 活性酸素曝露方法

活性酸素生成および曝露は Fig. 2-2 に示す活性酸素生成装置を使用した。活性酸素生成装置は 200 W 低圧水銀ランプを搭載した (QGL-200G2-3, 岩崎電気株式会社) 容積 23.8 L の処理チャンバーと、ロータリーポンプ、ピラニーゲージ、酸素ガスボンベで構成されている。ロータリーポンプとピラニーゲージでチャンバー内の大気を排出後、酸素ボンベから酸素を流入することでチャンバー内の雰囲気制御できる。また、試料台はステンレス製の金網で作製されており、紫外線ランプの距離を変更することによって紫外線の照射強度を制御できる。

滅菌バッグに包装した試料を紫外線ランプからの距離 140 mm の位置に置いた。ロータリーポンプで大気を排気し、ピラニーゲージを確認しながら 2 kPa まで酸素を流入した。低圧水銀ランプを点灯し、活性酸素生成雰囲気に試料を 30 分間置いた。

2.2.3. ESR 測定・評価方法

活性酸素曝露後の試料を滅菌バッグから取り出し、シャーレ内の活性酸素検知膜を TEMP 水溶液と同量の純水で溶解した。溶解した水溶液を毛細管キャピラリーで高さ 10 mm になるまで吸い上げ、キャピラリーパテで吸入部を塞いだ。外形 5 mm の ESR 試料管に試料を吸い上げたキャピラリーを入れ、ESR 装置 (JES-FA 200, JEOL Ltd.) 内に挿入し測定した。測定後のデータはマンガンマーカを基準に補正を行い、強度はマンガンマーカに対する強度比で評価した。

また、2.2.2 と同様に HPMC 水溶液と TEMPOL (Sigma-Aldrich Co., LLC., USA) 水溶液を混合し TEMPOL 混合 HPMC 膜を作製した後、同様に ESR 測定を行い、膜内 TEMPOL 濃度に対する ESR 強度を算出し検量線を作成した (Fig. 2-3)。

2.2.4. 有意差判定方法

上記評価系における変化を比較するために、t 検定を行った。有意水準は 5% とし、多重比較検定の結果、untreated と有意差を認めた場合は”※”，”**”，TCPS と有意差を認めた場合は”†”，活性酸素および紫外線曝露後の各条件間で有意差を認めた場合は”-”と表記した。

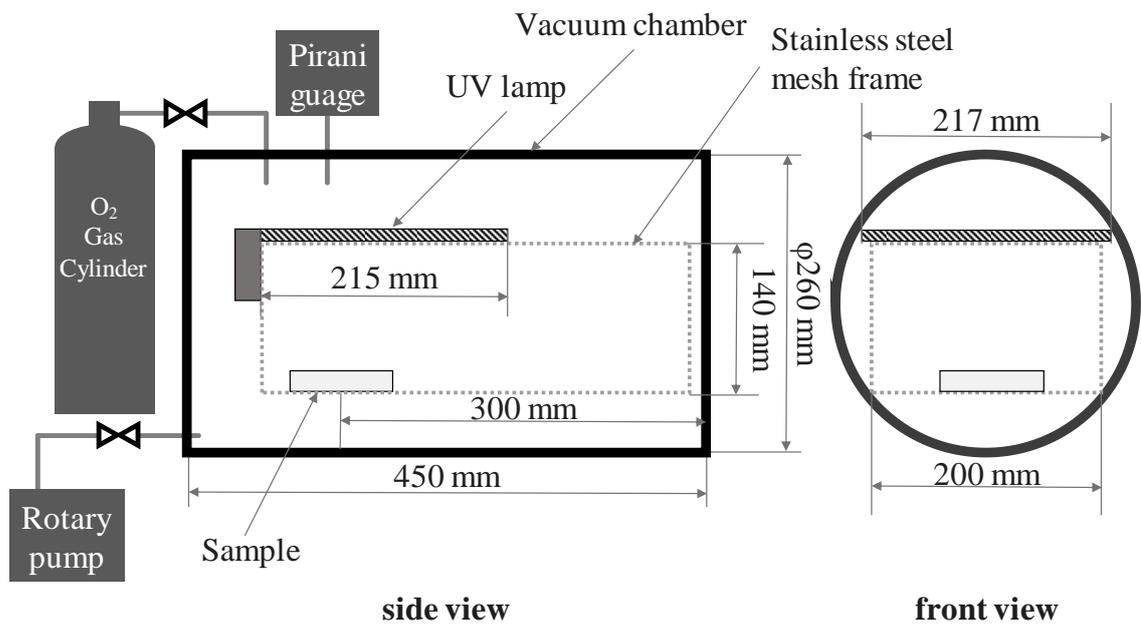


Fig. 2-2 活性酸素生成装置.

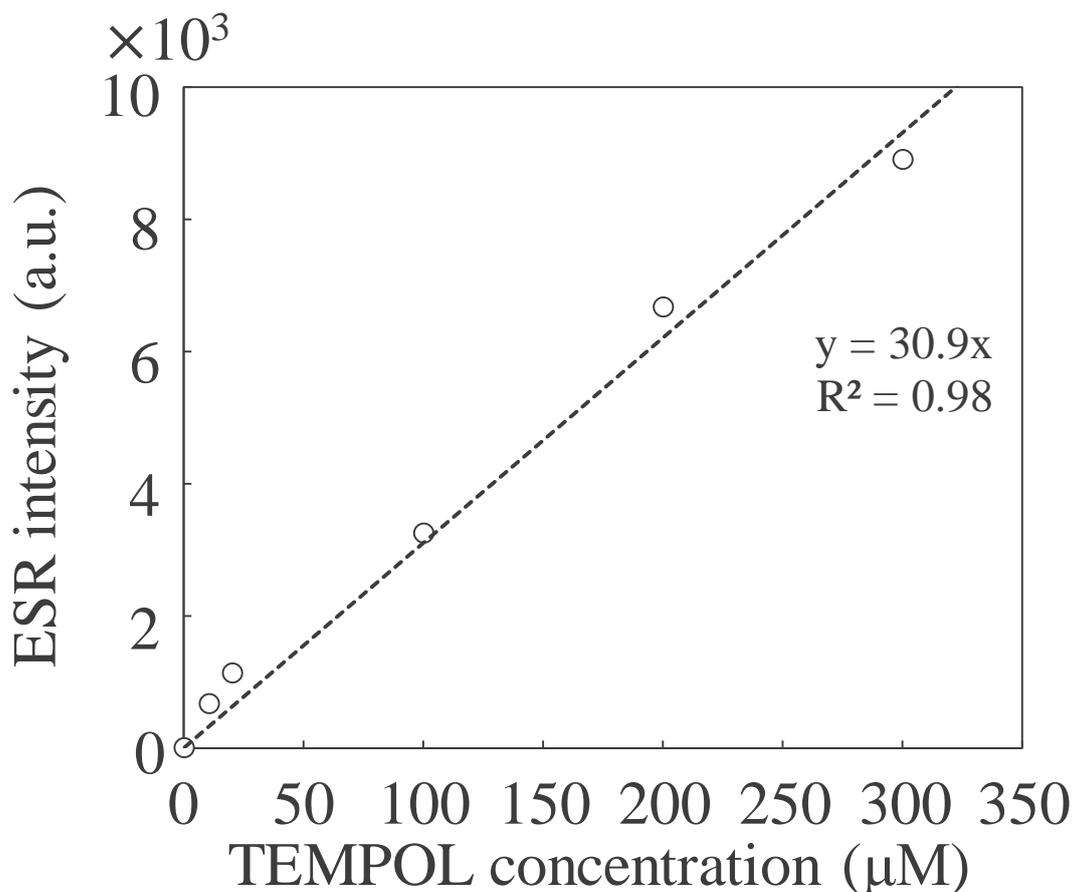


Fig. 2-3 TEMPOL 濃度による ESR 吸収強度.

2.3. 実験結果および考察

2.3.1. TEMP 混合 PVA, HPMC 膜の ESR 吸収強度の違い

Fig. 2-4 に活性酸素曝露前後の TEMP 混合 PVA, HPMC 膜の ESR スペクトルを示す. 317.5 および 326.5 mT 付近のピークは ESR 装置内の MgO 由来の標準スペクトルである. PVA, HPMC 膜ともに活性酸素曝露前の成膜時の段階でピークは検出されなかった. このことから, 膜作製時の熱や水溶性高分子と TEMP の混合によってラジカルは形成されず, TEMP が水溶性高分子内に未反応の状態で混合されたことが示された. 30 分間活性酸素に曝露した TEMP 混合水溶性高分子膜は, PVA, HPMC ともに TEMPOL の窒素酸化物ラジカルに起因する 3 本のピークが表れた. このことからどちらの活性酸素検知膜にも活性酸素が拡散し, 膜内の TEMP と反応したことが示された. また, ピークの強度は PVA と比較して HPMC が高かった.

Fig. 2-5 に活性酸素曝露後の TEMP 混合 PVA, HPMC 膜の ESR スペクトルの中央ピークから算出した ESR 強度の比較を示す. HPMC 膜は PVA 膜よりも ESR 強度が高く, その強度比は約 3.3 倍であった. このことから, 膜化材料の違いによって ESR 強度

に違いが表れることが示された。また、厚さ 30 μm と 100 μm PVA 膜の中央ピーク強度を比較した結果、102.3 および 77.6 であり、PVA は膜厚によって ESR 強度が変化しなかった。このことから、PVA は活性酸素と接する膜と活性酸素の界面付近の TEMP のみ反応していると推測された。

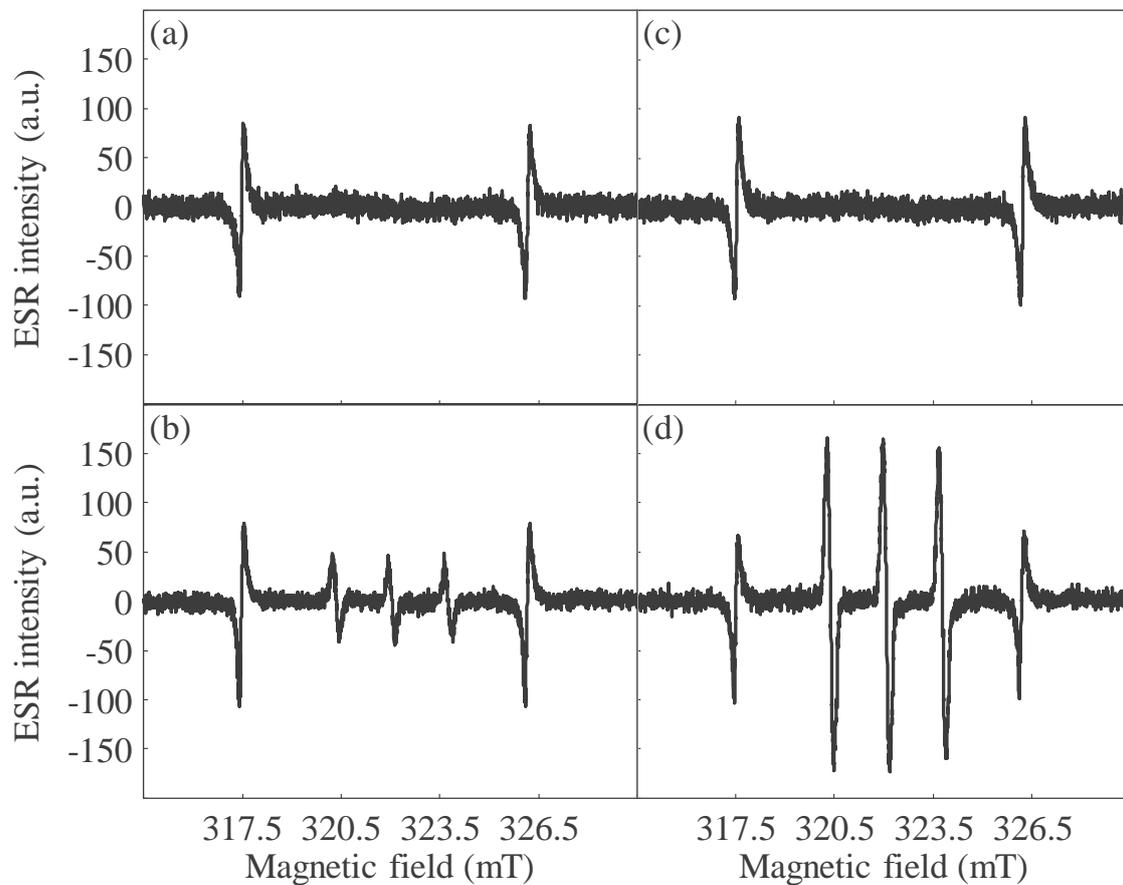


Fig. 2-4 活性酸素曝露前後の TEMP 混合 PVA 膜および HPMC 膜の ESR スペクトル.
 (a)活性酸素曝露前の PVA 膜, (b)活性酸素曝露後の PVA 膜, (c)活性酸素曝露前の HPMC 膜, (d)活性酸素曝露後の HPMC 膜.

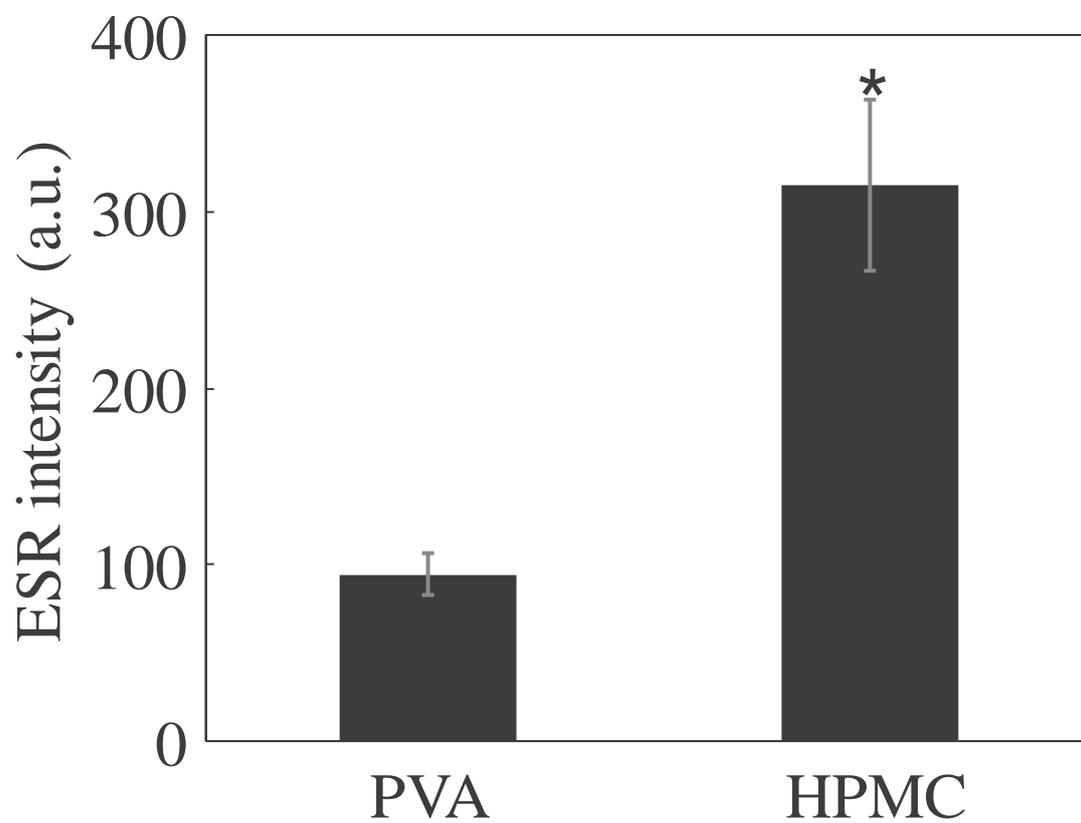


Fig. 2-5 膜化材料の違いによる ESR 強度の違い (mean±SD; $n = 3$. *: $P < 0.05$ vs. PVA).

Fig. 2-6 に TEMP 混合 HPMC 膜厚を変化させたときの膜内 TEMPOL 量を示す。膜内 TEMPOL 量は各膜厚における ESR 強度 (ESR intensity) を Fig. 2-3 より算出した TEMPOL 濃度に対する ESR 強度曲線の傾き (ESR intensity / $\mu\text{mol/L}$) で割った値と、その膜厚における TEMP 水溶液の量 (μL) の積より算出した。Fig. 2-6 の近似曲線はフィックの拡散方程式より算出した⁽²⁻¹¹⁾。材料内への拡散はフィックの法則によって説明される。本研究における活性酸素生成チャンバーは、膜の大きさに対して十分大きく、膜への拡散によって濃度が変化せず、拡散種である活性酸素は紫外線ランプ点灯時常に生成され続けるため一定に保たれていると想定される。この時のある距離における拡散種の濃度は以下の式で示される。

$$C(x, t) = C_s \operatorname{erfc}\left(\frac{x}{2\sqrt{Dt}}\right) \quad (2-1)$$

C は拡散種の濃度、 C_s は材料表面 ($x=0$) における拡散種の濃度、 D は拡散係数、 t は拡散時間、 x は拡散距離である。また補誤差関数は正規分布を示す誤差関数を用いて以下のように定義される。

$$\operatorname{erfc}(x) = 1 - \operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\pi}} \int_x^{\infty} \exp(-t^2) dt \quad (2-2)$$

したがって、拡散時間 t が一定で拡散種の濃度が一定の条件であれば、拡散係数 D が大きい場合拡散種は材料中に拡散しやすくなる。

ここで、拡散時間 t は曝露時間である 1800 秒とし、表面の TEMPOL 濃度 C_s は $x=0$ における TEMPOL 量と近似され、表面における TEMPOL 量と同義であることから、最も薄い膜厚の $1.5 \mu\text{m}$ の時の膜内 TEMPOL 量よりも小さい値とし、拡散係数 D は HPMC の酸素の拡散係数の文献値より $10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ オーダーとしてフィッティングを行った。 $C_s = 0.9 \text{ nmol}$, $D = 2.5 \times 10^{-8} \text{ cm}^2/\text{s}$ とした結果、膜内 TEMPOL 量は膜厚によって単調増加し、 $60 \mu\text{m}$ 付近から緩やかに増加し、活性酸素は TEMP 膜内にフィックの法則に従って拡散することが示された。また、少なくとも $100 \mu\text{m}$ にわたって拡散することが示された。

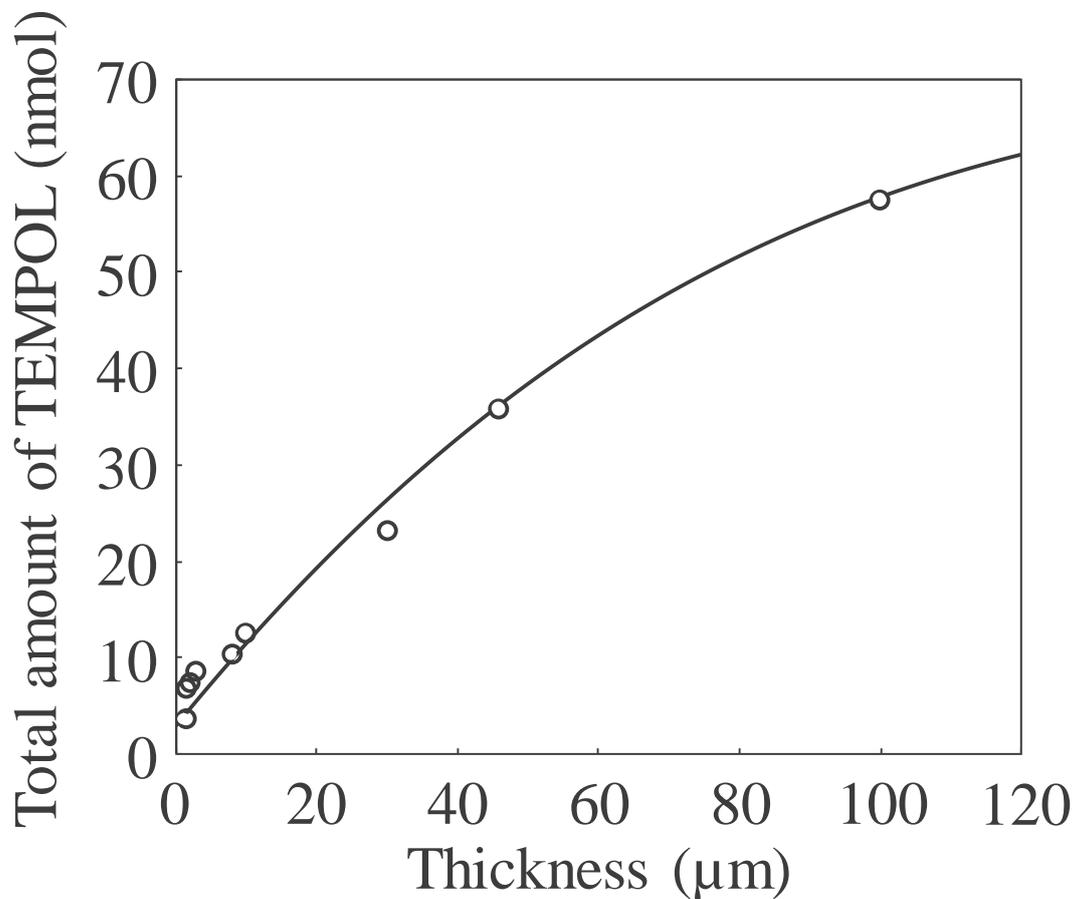


Fig. 2-6 HPMC 膜の膜厚と膜内 TEMPOL 量の関係.

2.4. 第2章のまとめ

ESR スピントラップ法を用いて、低真空環境で生成した活性酸素を検知するために、スピントラップ剤混合水溶性高分子フィルムを作製し、異なる膜材料による活性酸素検知性能への影響を調べた。その結果、膜材料に HPMC を使用して検出された活性酸素は、以前に報告された膜材料に PVA を使用した場合と比較して活性酸素検知性能が約 3.3 倍であることが示された。したがって、酸素透過性の高い材料を用いることにより、活性酸素の検出性能が改善されることが明らかになった。さらに、厚さの異なる HPMC 膜を作製することにより、活性酸素の HPMC 膜への拡散を調べた。活性酸素は HPMC 膜中に少なくとも 100 μm 拡散し、フィックの法則に従って、表面拡散種の濃度が一定に保たれている時の理想的な材料中への拡散と近い挙動を示すことがわかった。以上の結果から、TEMP 混合 HPMC 膜による活性酸素検知は PVA 膜よりも高い感度で活性酸素検知が可能であり、低真空環境下でも使用可能な技術であるといえる。

第2章 参考文献

- (2-1) R. Ono and T. Oda, Optical Diagnosis of Pulsed Streamer Discharge under Atmospheric Pressure, *International Journal of Plasma Environmental Science & Technology*, Vol.1, No.2 (2007), pp. 123-129.
- (2-2) R. Ono, Y. Yamashita, K. Takezawa and T. Oda, Behaviour of atomic oxygen in a pulsed dielectric barrier discharge measured by laser-induced fluorescence, *Journal of Physics D: Applied Physics*, Vol.38, No.16 (2005), pp. 2812-2816.
- (2-3) R. Ono, Y. Nakagawa, Y. Tokumitsu, H. Matsumoto, and T. Oda, Effect of humidity on the production of ozone and other radicals by low-pressure mercury lamps, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol. 274 (2014), pp. 13-19.
- (2-4) B. Vileno, A. Sienkiewicz, M. Lekka, A. J. Kulik and L. Forró, In vitro assay of singlet oxygen generation in the presence of water-soluble derivatives of C60, Vol.42, No.5-6 (2004), pp. 1195-1198.
- (2-5) F. Yoshino, H. Shoji and M.-C. Lee, Vascular effects of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) generated by photo-excitation on adrenergic neurotransmission in isolated rabbit mesenteric vein, *Redox Report*, Vol.7, No.5 (2002), pp. 266-270.
- (2-6) K. Oya, R. Watanabe, Y. Soga, Y. Ikeda, T. Nakamura and S. Iwamori, Effect of humidity conditions on active oxygen species generated under ultraviolet light irradiation and etching characteristics of fluorocarbon polymer, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol.298 (2015), pp. 33-39.
- (2-7) K. Yoshino and S. Iwamori, Measurement of excited singlet oxygen molecule in a vacuum sterilization system, using electric spin resonance (ESR) with a water-soluble polymer thin film, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, Vol.328 (2016), pp. 148-153.
- (2-8) C. Ding, M. Zhang and G. Li, Preparation and characterization of collagen/hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) blend film, *Carbohydrate Polymers*, Vol.119 (2015), pp. 194-201.
- (2-9) F. L. Laksmana, P. J. A. H. Kok, H. Vromans and K. Van derVoort Maarschalk, Predicting the diffusion coefficient of water vapor through glassy HPMC films at different environmental conditions using the free volume additivity approach, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.37, No.5 (2009), pp. 545-554.
- (2-10) 永井一清, 気体分離膜・透過膜・バリア膜の最新技術, シーエムシー出版, (2007).
- (2-11) H. メーラー, 藤川辰一郎訳, 固体中の拡散: 基礎と方法, 異種物質中の拡散, 拡散律速過程, 丸善出版, (2012).

第 3 章

紫外線励起活性酸素による 汎用性高分子材料の表面改質

3.1. 第3章の研究背景および目的

3.1.1. 汎用性高分子材料について

汎用性高分子材料は、軽量で安価かつ生産が安定しており、身の回りの製品だけでなく、工業や、農業、医療、薬学、生物研究分野など分野問わず幅広く利用されている。平成29年経済産業省生産動態統計年報 鉄鋼・非鉄金属・金属製品統計編によると、年間560万t以上のプラスチック製品が生産されており、生活には欠かせないものとなっている⁽³⁻¹⁾。

ポリエチレン (PE), ポリプロピレン (PP), ポリスチレン (PS) は代表的な汎用性高分子である⁽³⁻²⁾。Fig. 3-1 に PE, PP, PS の分子構造を示す。PE はメチレンが繰り返された構造を持ち、PP は PE の側鎖の水素がメチル基に置換されたような構造である。また PS は PE の側鎖の水素がベンゼン環に置換されたような構造を有する高分子材料である。

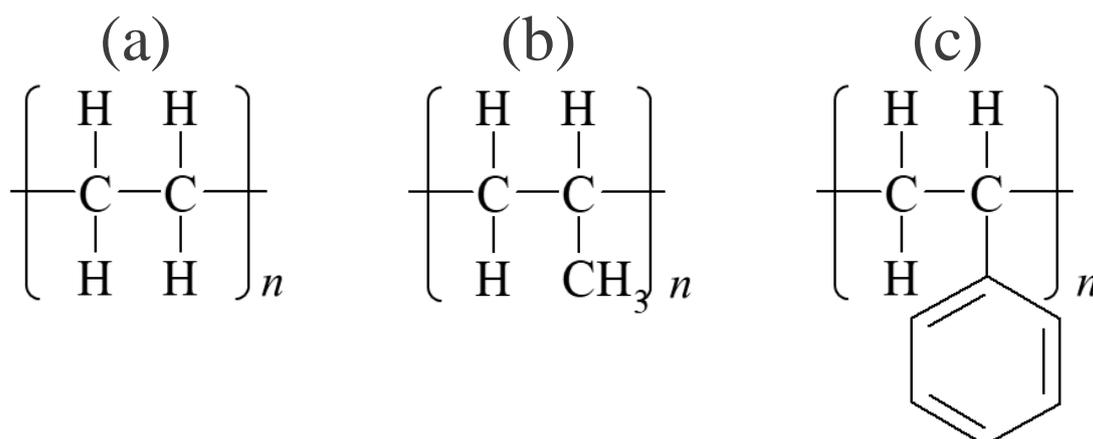


Fig. 3-1 汎用性高分子材料の分子構造. (a) PE, (b) PP, (c) PS.

3.1.2. 第3章の目的

本章では、基本骨格である PE 分子と、側鎖の構造が異なる汎用性高分子材料を活性酸素に曝露し、活性酸素による汎用性高分子材料の表面改質効果を比較することによって活性酸素が高分子材料の分子構造に与える変化を考察することを目的とした。

3.2. 実験方法・実験条件

3.2.1. 試料準備

PE (株式会社ミツバ), PP (株式会社ミツバ), PS (Falcon[®] 12 Well Clear Flat Bottom Not Treated Multiwell Cell Culture Plate, Product #351143, Corning Inc.) はそれぞれ1辺15mmの正方形に裁断した。エタノールで10分間超音波洗浄した後、ブローで乾燥させ、

直径 50 mm のガラス製のシャーレに入れた。ガラスシャーレに入れた試料は滅菌バッグで包装した。

3.2.2. 活性酸素曝露方法

活性酸素生成および曝露は Fig. 2-2 に示した活性酸素生成装置を使用した。滅菌バッグに包装した試料を紫外線ランプからの距離 140 mm の位置に置いた。ロータリーポンプで大気を排気し、ピラニーゲージを確認しながら大気圧まで酸素を流入した。低圧水銀ランプを点灯し、活性酸素生成雰囲気中に試料を 30 分間または 60 分間置いた。

3.2.3. AFM による表面粗さ測定方法

表面粗さは原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope; AFM, SPM-9700, Shimadzu Co.) によって評価した。5 μm 四方の範囲を走査した後、ランダムに 34 か所の断面プロフィールを抽出し線粗さを測定した。

3.2.4. 接触角測定方法

表面のぬれ性は水の接触角測定によって評価した。純水 5 μL を 10 mm の高さから滴下し、試料表面上の水滴を水平方向から撮影した。撮影した画像から、画像解析ソフト ImageJ (Ver.1.50i, アメリカ国立衛生研究所) を用いて水滴の高さ h とぬれ広がった水滴の半径 r を測定し、 $\theta/2$ 法 (式 4) より接触角を算出した⁽³⁻³⁾。

$$\theta = \tan^{-1} \frac{h}{r} \quad (3-1)$$

3.2.5. X 線光電子分光分析方法

表面組成および化学結合状態は X 線光電子分光 (X-ray Photoelectron Spectroscopy; XPS, Quantum 2000, ULVAC-PHI Inc.) によって評価した。X 線源には Al K α 線を使用し、PS 表面の C1s および O1s XPS スペクトルを得た。スペクトルの解析には、光電子分光分析ソフトウェア (PHI MultiPakTM Version 9, ULVAC-PHI Inc.) を使用した。C1s XPS スペクトルのピークトップを 284.8 eV に合わせてチャージアップの補正をした後、シャリー法によってバックグラウンドを処理した C1s および O1s XPS スペクトル面積から PS 表面の元素組成を解析した。感度係数は解析ソフトに記録されている値を使用し、炭素、酸素の感度係数はそれぞれ 0.314, 0.733 とした。

3.2.6. 有意差判定方法

上記評価系における変化を比較するために、t 検定を行った。有意水準は 5%として、検定の結果、untreated と有意差を認めた場合は“*”と表記した。

3.3. 実験結果および考察

3.3.1. 算術平均粗さ (R_a) の変化

Fig. 3-2 に活性酸素曝露時間による各高分子材料の R_a の変化を示す。PP は曝露時間によって表面粗さが減少傾向にあったが、PP, PE, PS 共に活性酸素曝露時間によって有意な表面粗さの変化は見られなかった。この結果から、長時間活性酸素に曝露してもプラズマ照射等の他のドライプロセスと比較してエッチングが少ない表面改質であると推測される。

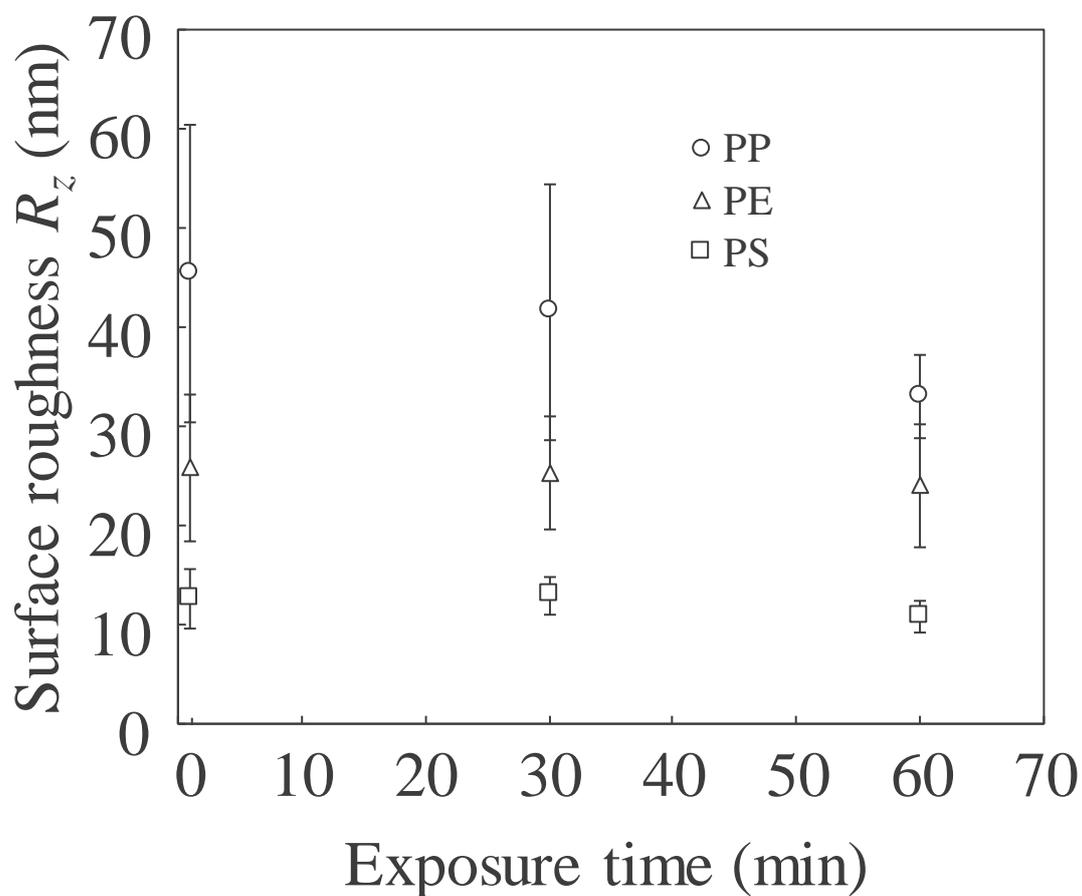


Fig. 3-2 活性酸素曝露時間による各高分子材料の R_a の変化 (copyright©2018 IEICE).

3.3.2. ぬれ性の変化

Fig. 3-3 に活性酸素曝露時間による各高分子材料の接触角の変化を示す. untreatedと比較してPE, PP, PS共に接触角が低下する傾向が見られた. また, PSが最も顕著に接触角が低下した. この結果から, 活性酸素は酸素プラズマ照射や紫外線照射など他のドライ環境で行われる高エネルギー照射による表面改質のように無差別に接触角の低下を起こさず, 分子構造によって大きく表面改質効果が異なる手法であることが明らかになった.

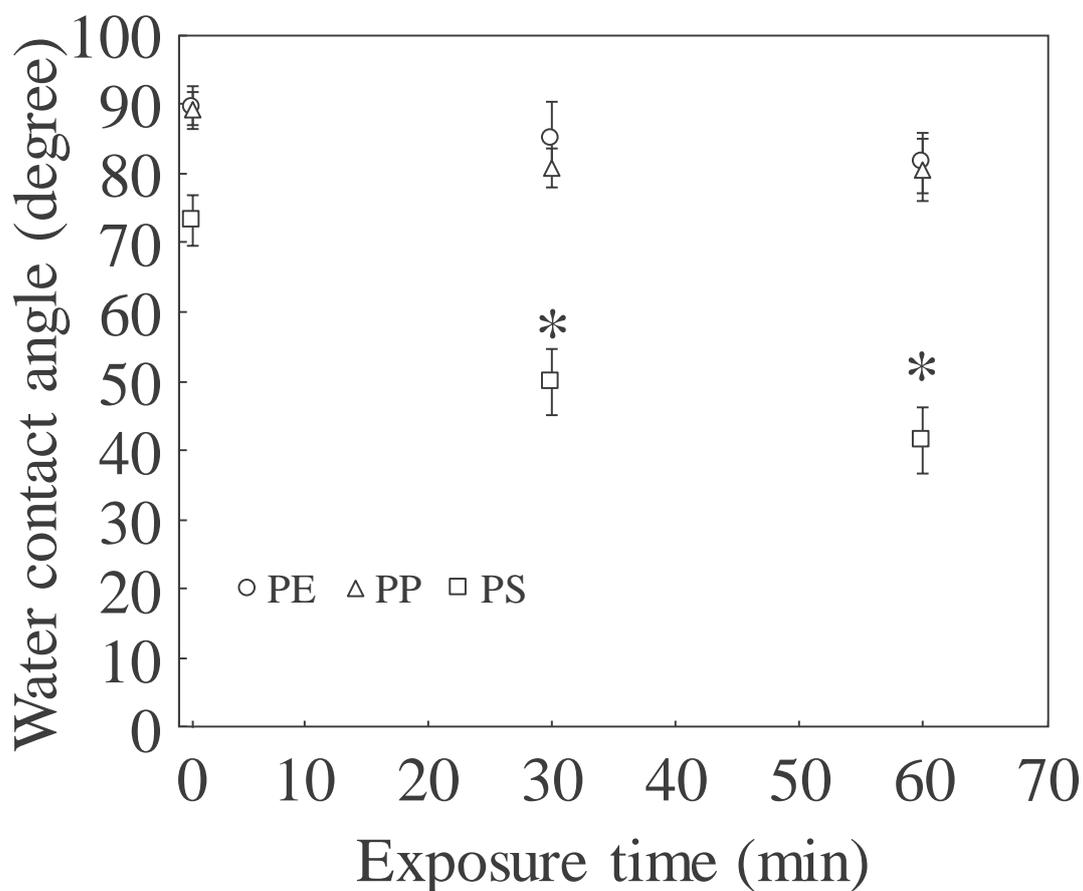


Fig. 3-3 活性酸素曝露時間による各高分子材料の接触角の変化 (mean±SD; n = 3. *: P<0.05 vs. 0 min) (copyright©2018 IEICE).

3.3.3. XPS スペクトルの変化

Fig. 3-4 に XPS によって解析した活性酸素曝露時間による各高分子材料の表面元素組成比の変化を示す. 全材料において活性酸素曝露時間によって表面に含まれる酸素の割合が増加した. 特に PS は酸素割合の増加量が最も多く, PE が最も少なかった.

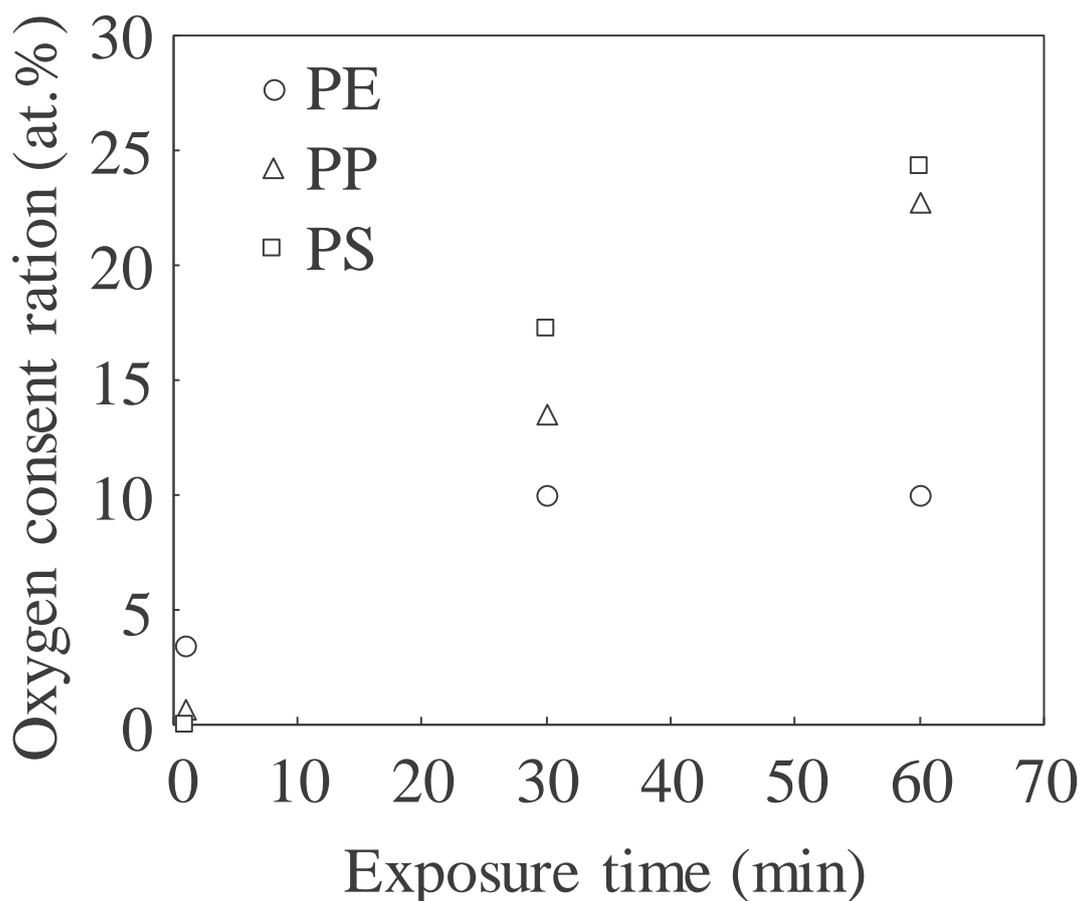


Fig. 3-4 XPS によって解析した活性酸素曝露時間による各高分子材料の表面酸素割合の変化.

Fig. 3-5 に活性酸素曝露時間による各高分子材料の C1s XPS スペクトルの変化を示す. PE, PP, PS 共に活性酸素曝露時間増加によって 284.8 eV 付近の C-C または C-H 結合を示すピークが減少した. また, 285.5 eV 付近の C-O 結合を示すピークが増加した. さらに, PS は 286.5 eV 付近の C=O 結合と 289 eV 付近の O=C-O 結合を示すピークが他の材料と比較して顕著に増加した. また, PS は側鎖のベンゼン環に由来する $\pi \rightarrow \pi^*$ shake up ピークの減少が見られた.

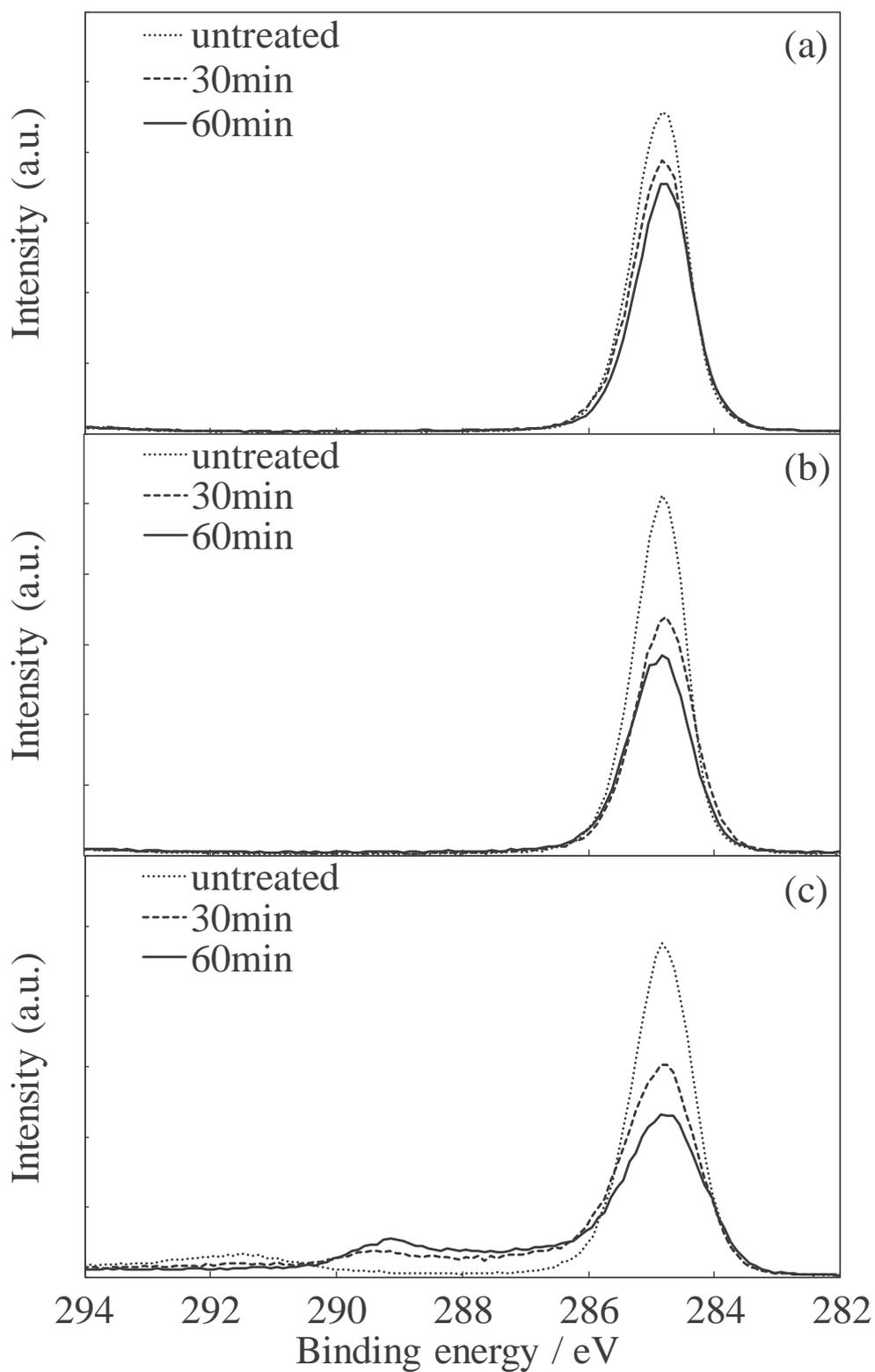


Fig. 3-5 活性酸素曝露時間による各高分子材料の C1s XPS スペクトルの変化. (a) PE, (b) PP, (c) PS, (copyright©2018 IEICE).

Fig. 3-6 に活性酸素曝露時間による各高分子材料の O1s XPS スペクトルの変化を示す。PE, PP, PS 共に活性酸素曝露時間増加によって 532 eV 付近の炭素酸素結合のピークが増加した。PE と比較して PP は、ピークが増加がより顕著にみられ、PS は高エネルギー側へのスペクトルの増加がみられた。これはヒドロキシ基に由来すると考えられ、Fig. 3-3 に示した PS の接触角の顕著な低下は、PS に見られるヒドロキシ基の増加に起因すると推測される。

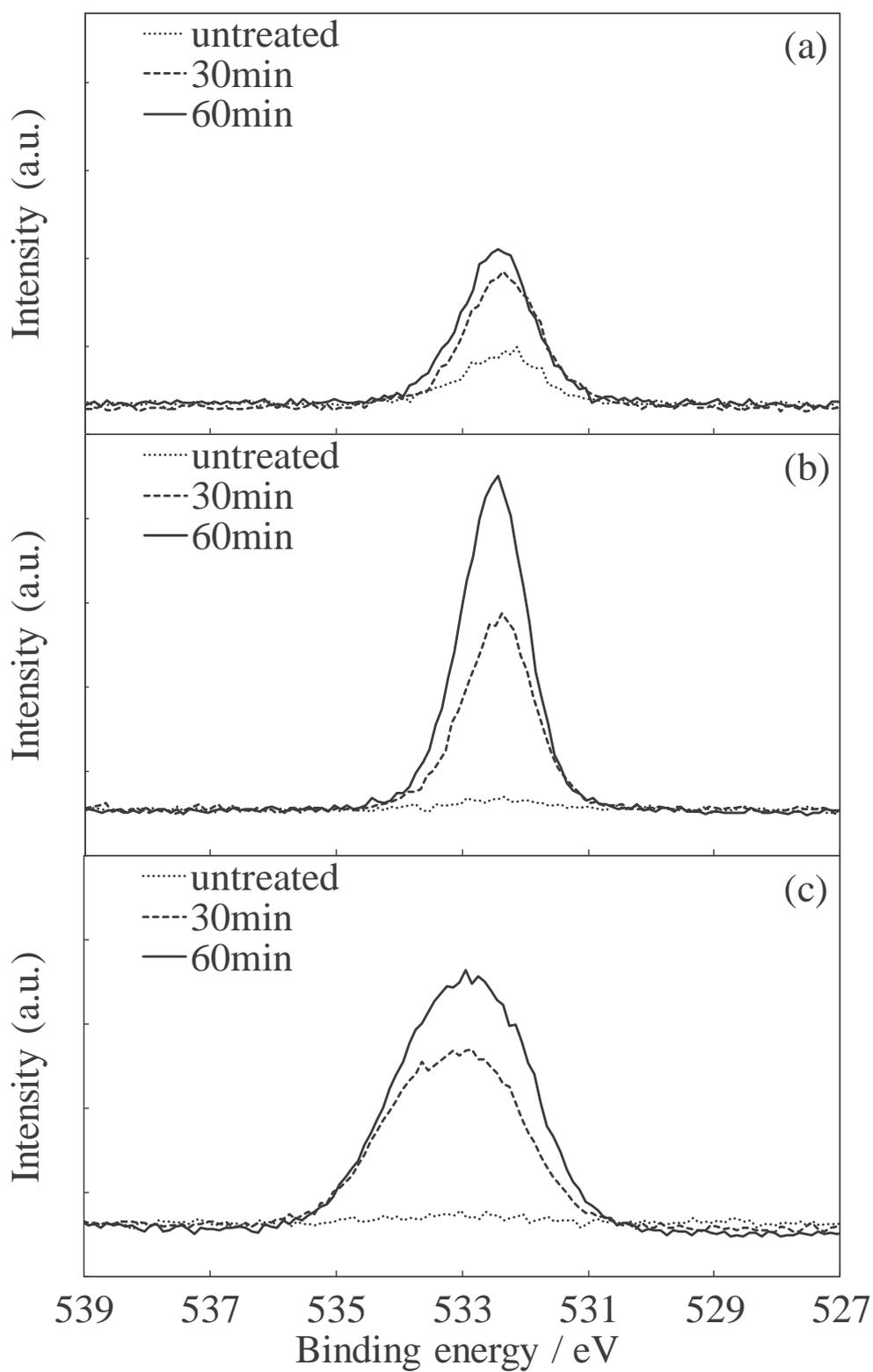


Fig. 3-6 活性酸素曝露時間による各高分子材料の O1s XPS スペクトルの変化.
 (a) PE, (b) PP, (c) PS, (copyright©2018 IEICE).

3.3.4. 考察

PE, PP, PS を活性酸素に曝露した結果, 全材料共に表面粗さに変化をおよぼさず, 材料によって化学的な変化とぬれ性に与える変化が異なることが明らかになった. これはそれぞれの分子構造に起因すると考えられる. PE は C-C 結合の主鎖に水素が結合した分子構造である. 一方 PP は PE の側鎖の水素の一部がメチル基に置換された構造である. PE の構造中には存在しない比較的反応性の高い第三級水素が PP の分子構造中に存在し, その結果 PE と比較して PP は酸素のスペクトルが大きかったと推測される⁽³⁻⁴⁾. また, PS は第三級水素の存在に加えてベンゼン環が分子構造中に存在する. ベンゼン環はラジカルやオゾンと反応することが知られている⁽³⁻⁵⁾⁻⁽³⁻⁷⁾. Fig. 3-5 に示した PS の C1s XPS スペクトルの結果より, ベンゼン環に由来する $\pi \rightarrow \pi^*$ shake up ピークの減少が見られたことから, 本実験においても, ベンゼン環の構造に対して活性酸素が作用し, その結果として, PE, PP と比較して多くカルボキシル基やヒドロキシ基の生成が起こったと推測される.

3.4. 第3章のまとめ

基本骨格である PE と側鎖の構造が異なる PP, PS を活性酸素に曝露し, 活性酸素による汎用性高分子材料の表面改質効果を比較し, そのメカニズムについて考察した. その結果, 活性酸素による表面改質は表面形状に物理的に変化を伴わないことが明らかになった. また, 表面化学状態や酸素量, ぬれ性に変化をおよぼすことが明らかになった. これらの作用は側鎖の分子構造によって異なり, ベンゼン環を有する PS はラジカルやオゾンによる酸化反応が起こりやすく, 表面改質効果が顕著に表れたと考えられる. 以上より, 活性酸素による表面改質は酸化反応を主体とする化学的な表面改質手法であることが明らかになった.

第3章 参考文献

- (3-1) 経済産業省 HP, 平成 29 年 経済産業省生産動態統計年報 鉄鋼・非鉄金属・金属製品統計編, http://www.meti.go.jp/statistics/tyo/seidou/result/ichiran/08_seidou.html
- (3-2) 岩森暁, 機械材料の物性と応用, 技報堂出版, (2006).
- (3-3) 日本規格協会, 基板ガラス表面のぬれ性試験方法, JIS R 3257, (1999).
- (3-4) K. P. C. Vollhardt, N. E. Schore, ボルハルト・ショアー 現代有機化学第 6 版上, 同人化学 (2011).
- (3-5) S. Iwamori, N. Nishiyama and K. Oya, A colorimetric indicator for detection of hydroxyl radicals in atmosphere using a methylene blue dye based on nafion film, *Polymer Degradation and Stability*, Vol. 123 (2016), pp. 131-136.
- (3-6) I.V. Tokmakov, G.-S. Kim, V.V. Kislov, A.M. Mebel, and M.C. Lin, The Reaction of Phenyl Radical with Molecular Oxygen: A G2M Study of the Potential Energy Surface, *The Journal of Physical Chemistry A*, Vol. 109, No. 27 (2005), pp. 6114-6127.
- (3-7) Y. Murakami, T. Oguchi, K. Hashimoto, A. Nakamura, Y. Sakai and H. Ando, Density functional study of the phenylethyl + O₂ reaction: Kinetic analysis for the low-temperature autoignition of ethylbenzenes, *International Journal of Quantum Chemistry*, Vol. 112 (2012), pp. 1968-1983.
- (3-8) 眞鍋敬, ラジカル反応, 化学と教育, Vol. 69, No.9 (2008), pp. 454-457.

第 4 章

ポリスチレン表面の改質効果と 細胞接着性向上因子の考察

4.1. 第4章の研究背景および目的

第3章において活性酸素による表面改質効果が最も顕著に表れたPSを供試材料とし、活性酸素による表面改質メカニズムについてより詳細に検討を行った。活性酸素曝露条件を変更することによって表面改質効果に与える影響と、表面改質層の詳細な評価を行うことにより、活性酸素によるPSの表面改質メカニズムを考察した。また、一般的に酸素プラズマ照射が施されたPSと比較することによって、従来の表面改質手法に対する活性酸素による表面改質の位置づけを明らかにした。

4.1.1. PSの細胞培養基板としての利用

生体機能の解明、新薬の開発、再生医療などの分野において、生命の最小単位である細胞を培養してさまざまな試験が行われている。培養細胞のほとんどは浮遊した状態では生存や増殖ができない接着系の細胞であり、接着系の細胞の培養には足場となる細胞培養基板が必要である。PSは耐酸・塩基性、高透明性、成形時の寸法安定性といった特性を有し、ディスプレイ用細胞培養基板材料として広く用いられている。しかしながら、PS製細胞培養基板は細胞接着性が乏しいため、細胞接着性向上を目的とした表面改質を施す必要がある。

また、PSを細胞培養基板として使用するためには滅菌処理も必須である。通常の滅菌処理は、処理後の滅菌効果を維持するために、滅菌対象物を滅菌バッグで包装した状態で行われている。従来のPS製細胞培養基板のようなプラスチック製品を対象とした滅菌処理は、低温で滅菌バッグ内部の滅菌が可能であるガンマ線を用いた放射線照射滅菌が主流となっている。したがって、従来のPS製細胞培養基板に対する表面改質は、酸素プラズマ照射による表面改質と放射線による滅菌処理の2つの工程に分かれ、処理工程が煩雑かつ大規模になることから、処理の簡便化と低コスト化が望まれている。

4.1.2. 材料の表面特性と細胞接着性の関係

材料表面の化学的、物理的な特性と細胞接着性は密接に関係していることが知られている。Arimaらは、自己組織化単分子膜を用いて表面の化学的な特性やぬれ性を制御した表面上で細胞培養を行った結果、極性をもった官能基を有する表面や、接触角が40°から60°程度の親水性表面は優れた細胞接着性を示すことを報告している⁽⁴⁻¹⁾。また、マイクロ・ナノスケールの表面粗さや表面形状は、細胞の接着や伸展、配向に影響をおよぼすことが報告されている⁽⁴⁻²⁾。また、Loesbergらは幅100nmより小さいピッチ、または深さ35nmより浅い溝は、細胞が認識できないことを報告している⁽⁴⁻³⁾。

4.1.3. 細胞接着性向上を目的とした従来の表面改質と活性酸素による表面改質

細胞接着性向上に寄与する表面特性を付与する表面改質技術として、特に酸素プラズマ照射による表面改質について数多くの報告がある^{(4-4),(4-5)}。そして、現在市販されて

いる PS 製細胞培養基板は酸素プラズマ照射が施されたものが一般的に採用されている(4-6).

第2章では、汎用性高分子材料である PS, ポリエチレン (PE), ポリプロピレン (PP) を滅菌バッグで包装し、活性酸素に曝露した結果、全材料に対してぬれ性の向上や、高分子鎖中の炭素-炭素結合や炭素-水素結合に活性酸素が作用することにより、カルボキシ基などの極性基の付与といった表面改質効果を得られることがわかっている(4-7).

4.1.4. 第4章の目的

活性酸素は紫外線と酸素の光化学反応によって生成されることから、紫外線の照度が高いほど活性酸素の生成量は多くなり、表面改質効果の向上につながると期待できる。本章では紫外線ランプと PS 製細胞培養基板の距離や活性酸素曝露時間といった活性酸素曝露条件を変更することによる表面改質効果に与える影響と、改質層の詳細な評価を行うことによって、活性酸素による PS の表面改質メカニズムを考察した。さらに、活性酸素によって表面改質が施された PS 製細胞培養基板と、酸素プラズマ照射によって表面改質が施された市販の PS 製細胞培養基板の表面特性の違いについて詳細に比較をした上で、両者の細胞接着性を評価し、細胞接着性向上に支配的な材料の表面特性を考察した。

4.2. 実験方法・実験条件

4.2.1. 試料準備

未処理の PS 製細胞培養基板（以下 untreated, Falcon® 12 Well Clear Flat Bottom Not Treated Multiwell Cell Culture Plate, Product #351143, Corning Inc.）を試験材料として使用した。別途洗浄は行わず、開封した細胞培養基板をそのまま使用した。

4.2.2. 活性酸素曝露方法

プラスチックフィルムと活性酸素が通過できるパルプ紙を貼り合わせて構成された滅菌バッグ（SURE-CHECK® Sterilization Pouches, Crosstex International Inc.）に PS 製細胞培養基板を包装し、滅菌バッグの 4 辺をヒートシールによって密封した。活性酸素生成および曝露は Fig. 2-2 に示した活性酸素生成装置を使用した。滅菌バッグに包装した試料を紫外線ランプからの距離 70 mm, 100 mm または 140 mm の位置に置いた。ロータリーポンプで大気を排気し、ピラニーゲージを確認しながら大気圧まで酸素を流入した。低圧水銀ランプを点灯し、活性酸素生成雰囲気中に試料を 20 分間, 40 分間または 60 分間置いた。

4.2.3. 比較対照

活性酸素による表面改質効果を確認するために、untreated と酸素プラズマ照射による細胞接着性向上を目的とした表面改質およびガンマ線照射による滅菌が施された市販品（以下 TCPS: Tissue culture polystyrene, Falcon® 12 Well Clear Flat Bottom TC-Treated Multiwell Cell Culture Plate, Product #353225, Corning Inc.）の 2 種類を比較対照として使用した。

4.2.4. 接針式線粗さ測定装置による表面粗さ測定方法

接針式線粗さ測定装置（Dektak® XT, Bruker Co.）によって表面粗さを評価した。1 mm の距離を接針荷重 2 mg で走査し表面プロファイルを得た。得られた表面プロファイルから、付属のソフトウェアにより算術平均粗さ R_a 解析し、表面の線粗さを評価した。粗さとうねりの閾値は JIS B 0601 に従い、0.08 mm とした。

4.2.5. 接触角測定方法

接触角測定は3.2.4. 接触角測定方法と同様に評価した。

4.2.6. X線光電子分光分析方法

表面組成および化学結合状態はXPS (PHI Quantera II™, ULVAC-PHI Inc.) によって評価した。X線源にはAl K α 線を使用し、PS表面のC1sおよびO1s XPSスペクトルを得た。

また、Angle Resolved XPS (AR-XPS) 法によって、深さ方向解析を行った。ARXPSは光電子の放出角度を変えることによって、非破壊的に異なる深さから光電子を検出する方法である。検出深さ d は以下のように示すことができる。

$$d = d_0 \sin \theta \quad (4-1)$$

ここで、 θ は光電子の放出角、 d_0 は $\theta=90^\circ$ の時の検出深さである。試料台の角度を段階的に変更することによって光電子の放出角を変化させることによって深さ方向解析を行った。

スペクトルの解析には、光電子分光分析ソフトウェア (PHI MultiPak™ Version 9, ULVAC-PHI Inc.) を使用した。C1s XPS スペクトルのピークトップを 285 eV に合わせてチャージアップの補正をした後、シャリー法によってバックグラウンドを処理したC1s および O1s XPS スペクトル面積からPS表面の元素組成を解析した。感度係数は解析ソフトに記録されている値を使用し、炭素、酸素の感度係数はそれぞれ 0.314, 0.733 とした。

4.2.7. 紫外線照度測定方法

活性酸素に曝露した試料位置における、波長 185 nm および 254 nm の紫外線の照度を測定した。照度計は真空中に置くことができないため、チャンバー内に酸素を流量 20000 cc/min で 5 分間流し続けることにより、庫内の酸素濃度を 99.9%以上としてPS製細胞培養基板を活性酸素に曝露した時の酸素濃度に近づけた。紫外線ランプを点灯し、照度が安定したときの値を各測定点における照度とした。

4.2.8. 活性酸素濃度測定

活性酸素の濃度測定は、第2章で作製した水溶性高分子とスピントラップ剤の混合膜を用いた、ESRスピントラップ法によって行った。O₂(¹O_g)のスピントラップ剤として、TEMPを使用した。膜化材料には、ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を使用した。50 mM に調製した 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinol (TEMP) 水溶液と、2.5 wt%に調製した HPMC 水溶液を体積比 1 : 1 で混合し、直径 55 mm のPS製シャーレに

2000 μL 入れた。40°C の恒温槽内で 2 時間乾燥し、活性酸素検知膜を作製した。滅菌バッグで包装した検知膜は、チャンバー内のランプから距離 140 mm または 70 mm の位置に置き、4.2.2. 活性酸素曝露方法と同様の条件で活性酸素に曝露した。活性酸素曝露前後の検知膜を 1000 μL の純水で溶解して、毛细管 (キャピラリー) で吸い上げたものを測定試料とし、溶液中の TEMPOL 量を ESR 装置 (JES-FA200, 日本電子株式会社) で測定した。標準スペクトルである MnO 由来のマンガンマーカに対する強度から、活性酸素検知量を算出し、紫外線ランプからの距離の違いによる活性酸素生成量の変化を比較した。

4.2.9. 細胞接着性評価

活性酸素曝露による PS 製細胞培養基板の細胞接着性の変化は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1) を培養することによって評価した。基本培地 (α -MEM, Thermo Fisher Scientific Inc.) に濃度 10% になるようにウシ胎児血清を添加し、抗生物質・抗真菌剤 (10000 U/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B, Thermo Fisher Scientific Inc.) を濃度 1% になるように添加したものを培養培地とした。各 PS 製細胞培養基板に初期細胞密度 3000 cells/cm² で播種し、庫内温度 37°C, 二酸化炭素濃度 5% のインキュベーター内で 24 時間培養した。24 時間培養後の細胞に 2.5% のグルタルアルデヒド溶液を加え、24 時間固定した後、エタノールを用いて上昇系列脱水を行った後、エタノールを t-ブチルアルコールに置換して凍結乾燥 (JEOL-JFD310, 日本電子株式会社) を行った。乾燥した試料にオスミウムをコート (Neoc-STB, メイワフォーシス株式会社) した後に、金を (JFC-1100E, 日本電子株式会社) 蒸着し、走査型電子顕微鏡 (SEM: Scanning Electron Micro-scope, JSM-6510, 日本電子株式会社) によって細胞の形態を観察した。

SEM 像から無作為に細胞を選定し、接着した細胞の面積を画像解析ソフト ImageJ によって測定した。それぞれの細胞の平均面積から細胞接着性を評価した。また、面積の分布の傾向を比較した。

4.2.10. 有意差判定方法

上記評価系における変化を比較するために、t 検定を行った。有意水準は 5% とし、検定の結果、untreated と有意差を認めた場合は“**”，その他比較対照試料との有意差を認めた場合は“†”と表記した。

4.3. 実験結果および考察

4.3.1. 活性酸素による表面改質におよぼす紫外線ランプと PS 製細胞培養基板との距離の影響

4.3.1 項では紫外線ランプと試料の距離が活性酸素による表面改質に与える影響を調査した。紫外線ランプと試料の距離を試料名とした。

4.3.1.1. 算術平均粗さ (R_a) の変化

Fig. 4-1 に各 PS 表面の算術平均粗さを示す。TCPS は他の条件と比較して 1 nm 程度粗さが有意に大きかった。活性酸素に曝露した PS 表面の粗さは untreated と比較して変化はわずかであり、紫外線ランプと距離が近い 70 mm においても粗さの変化が小さかったことから、活性酸素は表面粗さに変化をおよぼさない表面改質手法であると考えられる。

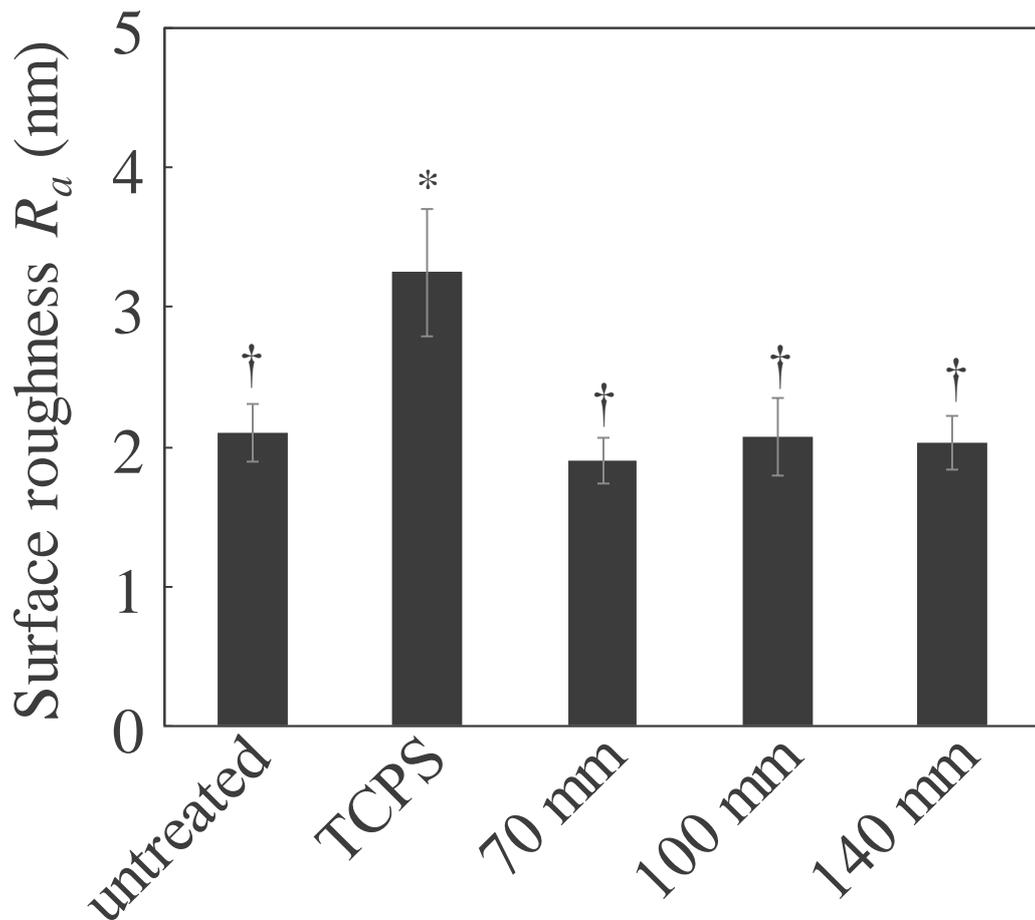


Fig. 4-1 各 PS 表面の算術平均粗さの比較 (mean±SD; $n = 3$. *: $P < 0.05$ vs. untreated, †: $P < 0.05$ vs. TCPS).

4.3.1.2. 紫外線ランプと PS 基板の距離による表面元素組成の変化

Table 4-1 に各 PS 表面の元素組成比を示す. 酸素と炭素以外の元素は検出されなかった. 各 PS 表面の酸素の割合を比較すると, untreated では 1 at. % だったのに対して, 紫外線ランプとの距離が全条件中で最も遠い 140 mm は 8 at. % まで増加した. 紫外線ランプとの距離を近づけると段階的に酸素の割合がさらに増加し, 70 mm は TCPS と同等の 12 at. % まで増加した. 以上の結果から, 活性酸素曝露は酸素プラズマ照射と同等に PS 表面に酸素の導入が可能な手法であることが示された.

Table 4-1 各 PS 表面の元素組成比.

	Carbon	Oxygen
untreated	99	1
TCPS	88	12
140 mm	92	8
100 mm	90	10
70 mm	88	12

Atomic %

4.3.1.3. PS 表面の XPS スペクトルの変化と元素分析結果

Fig. 4-2 に各 PS 表面の C1s XPS スペクトルを示す. *untreated* と比較してどの条件も, 紫外線ランプと試料の距離を近づけることにより, PS の骨格を構成する C-C, C-H 結合を示すピーク強度が減少した. ワイドスキャンの結果から, *untreated*, TCPS および活性酸素に曝露した PS 表面上に炭素と酸素以外のピークは観測されなかった. 以上の結果から, C-C, C-H 結合を示す 285 eV 付近のピークよりも高エネルギー側に観測されたブロードなピークは炭素と酸素の結合に由来すると考えられる. 紫外線ランプと試料の距離を近づけることにより, 炭素と酸素の結合に由来するピークが顕著に現れた.

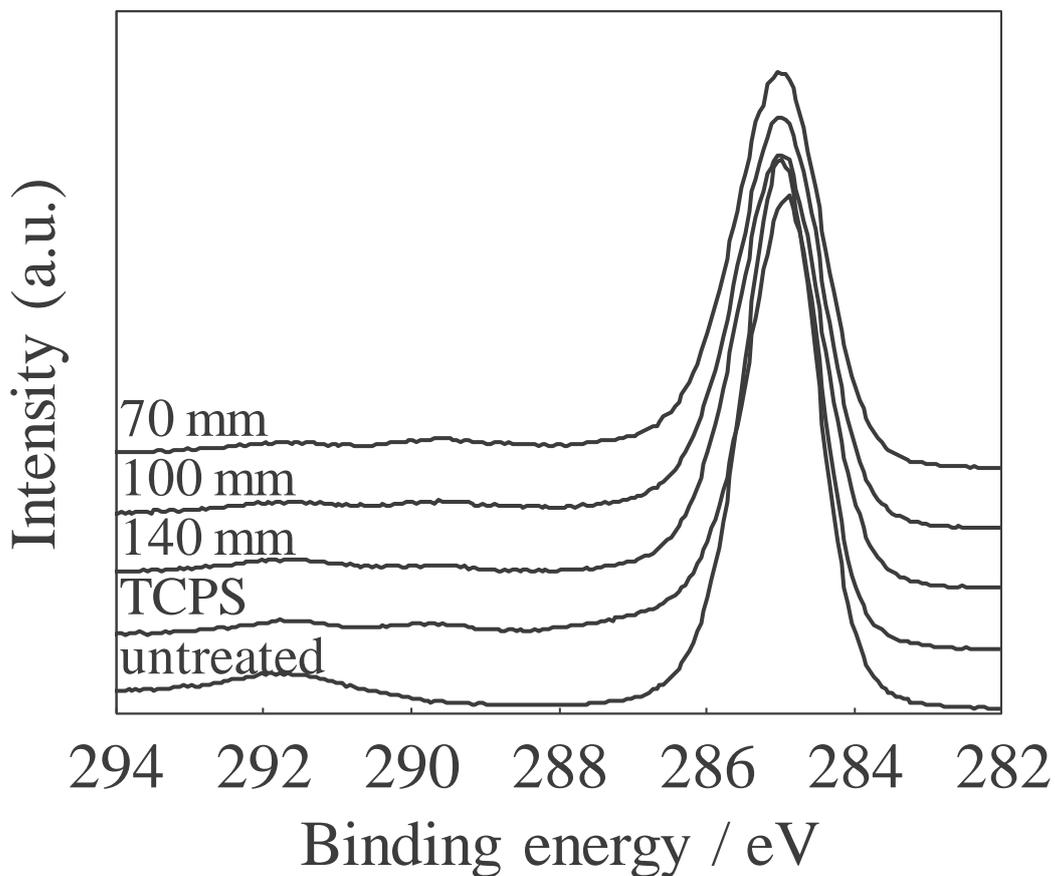


Fig. 4-2 各 PS 表面の C1s XPS スペクトル.

炭素と酸素の結合を、エーテルやヒドロキシ基 (-C-O-, 286.3 eV), ケトンやアルデヒド(-C(=O)-, 288.0 eV), カルボキシ基 (-COOH, 289.5 eV), カーボネート結合 (-O-C(=O)-O-, 290.0 eV), ベンゼン環由来の $\pi \rightarrow \pi^*$ shake up (291.7 eV) にピーク分離した結果を Table 4-2 示す^{(4-8), (4-9)}. TCPS と比較して活性酸素に曝露した PS 表面は, 炭素と酸素の二重結合を多く含むピークが増加した. 一方, 活性酸素に曝露した PS 表面と比較して, TCPS はヒドロキシ基など炭素と酸素の単結合を多く含むピークが多く検出された. また, ベンゼン環に由来する $\pi \rightarrow \pi^*$ shake up ピークは紫外線ランプとの距離が近い条件ほど減少する傾向にあった.

Table 4-2 C1s XPS スペクトルの波形分離結果.

	Shake up	O(C=O)O	COOH	C=O	C-O	C-C
B.E. (eV)	291.7	290.0	289.5	288.0	286.3	285
untreated	4.2	0	0	0	0.3	95.5
TCPS	3.5	1	1.4	2.1	6.9	85.1
140 mm	4	0.3	1.3	0.5	4.5	89.4
100 mm	3.7	0.2	2.8	1.7	5.5	86.1
70 mm	3.4	0.2	3.4	2.3	5.4	85.3

Atomic %

Fig. 4-3 に各 PS 表面の O1s XPS スペクトルを示す。スペクトルの半値幅が広く、高エネルギー側にブロードなスペクトルが観測された。このことから複数の状態の酸素と他元素の結合があると考えられる。また、Fig. 4-2 の C1s XPS スペクトルの結果から、C-O、C=O、および OH 結合であると推測される。また、紫外線ランプと試料の距離を近づけることによって、スペクトル強度が増加した。紫外線ランプと試料の距離が 70 mm の条件で活性酸素に曝露した TCPS と同等のスペクトル強度であった。

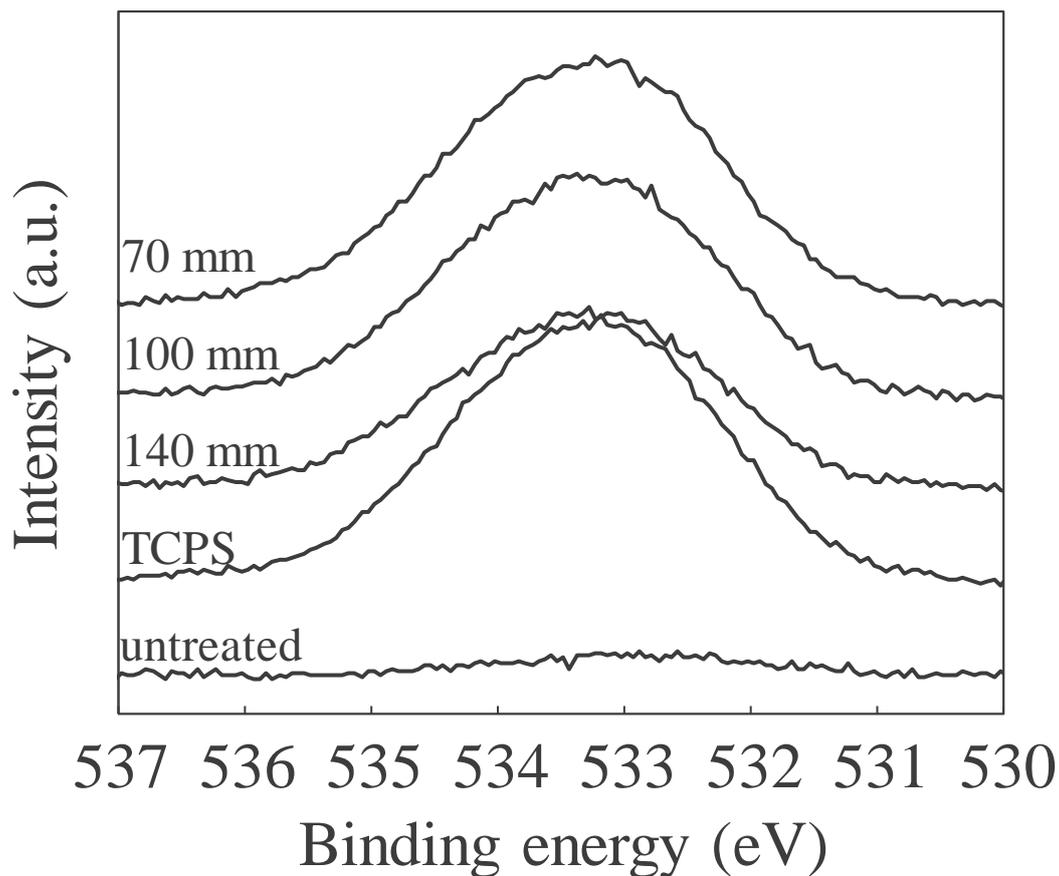


Fig. 4-3 各 PS 表面の O1s XPS スペクトル。

4.3.1.4. PS 表面の接触角の変化

Fig. 4-4 に各 PS 表面と水の接触角測定結果を示す. untreated と比較して活性酸素に曝露した条件はどれも接触角が有意に低下した. 紫外線ランプと試料の距離が近づくほど接触角が低下し, 70 mm の接触角は 61°だった. TCPS の接触角は 36°であり, 活性酸素によって表面改質を施した PS 表面よりも有意に低い値を示した.

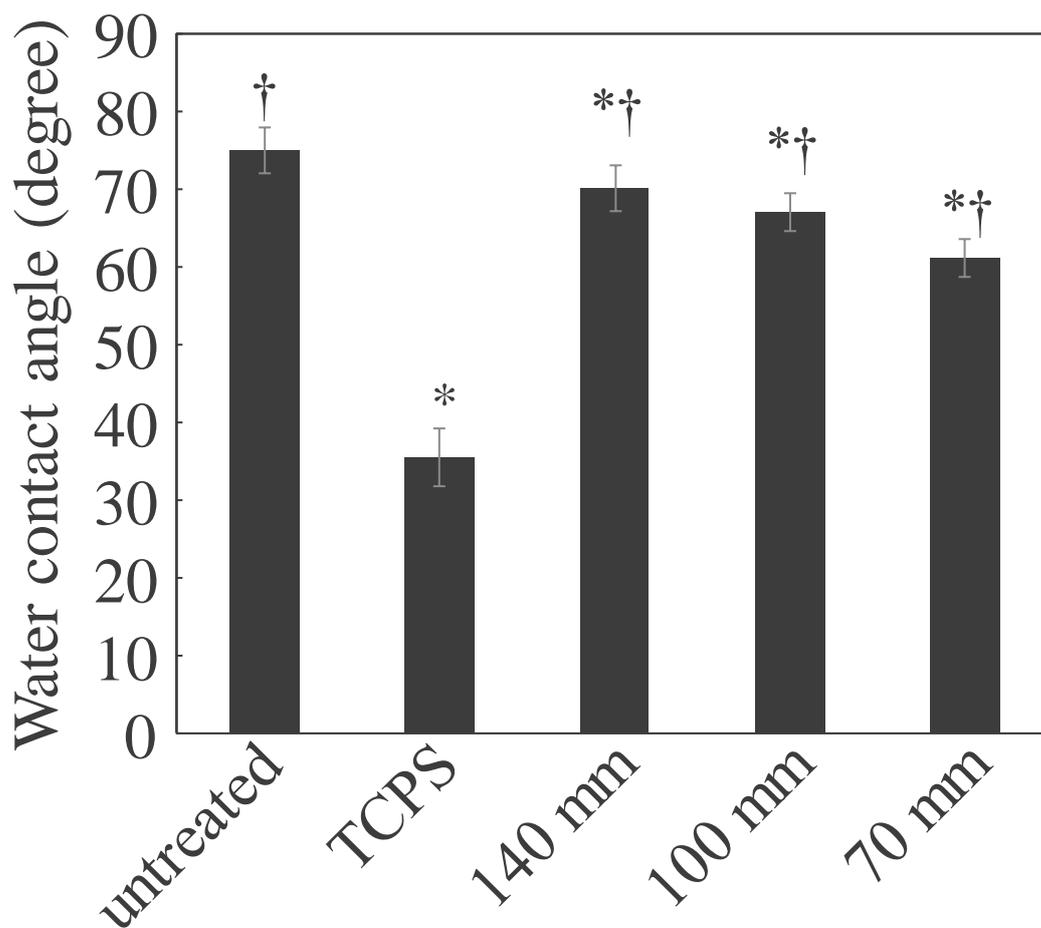


Fig. 4-4 各 PS 表面と水の接触角 (mean±SD; $n = 24$. *: $P < 0.05$ vs. untreated, †: $P < 0.05$ vs. TCPS).

4.3.1.5. 紫外線ランプとの距離による紫外線照度および活性酸素生成量の比較

Fig. 4-5 に紫外線ランプと試料の距離と、波長 185 nm および 254 nm の紫外線の照度の関係を示す。紫外線ランプとの距離が 70 mm の位置では波長 185 nm と 254 nm の紫外線がともに試料まで到達した。紫外線ランプとの距離が離れると次第に照度が減少し、140 mm では波長 185 nm の紫外線は試料まで到達しなかった。

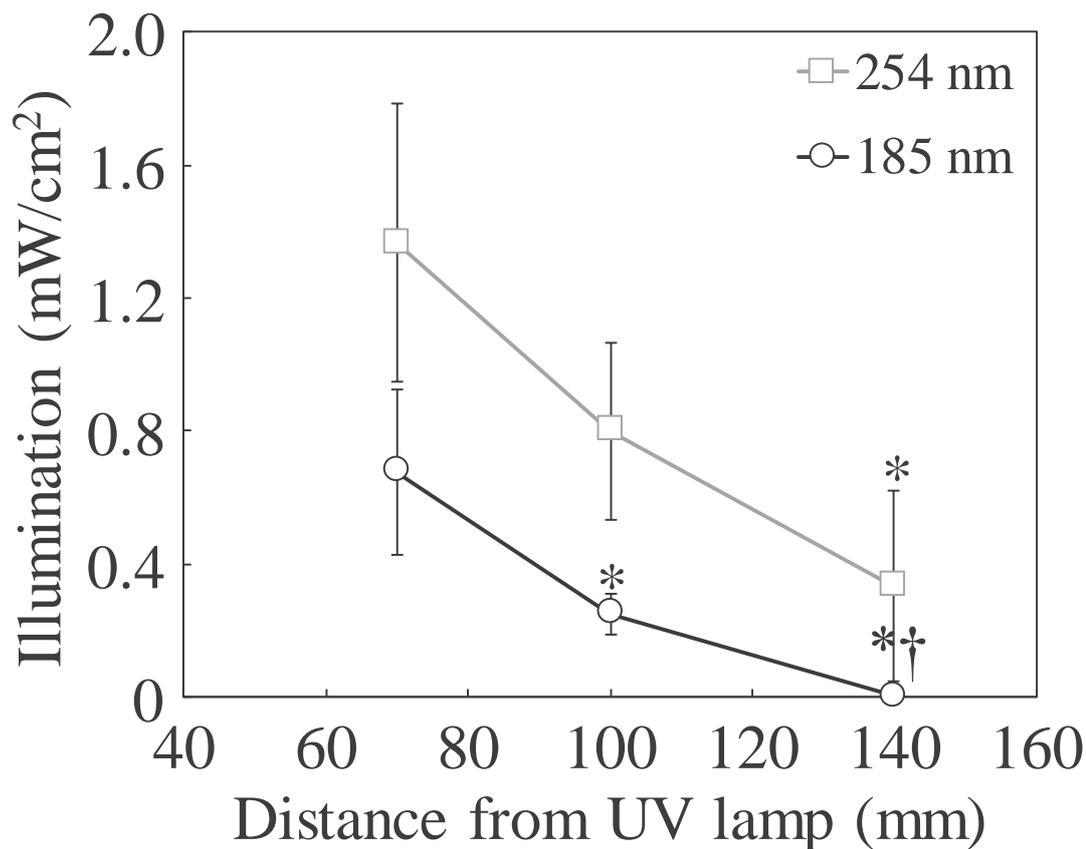


Fig. 4-5 紫外線ランプと試料の距離による波長 185 nm および 254 nm の紫外線の照度の変化 (mean±SD; $n = 3$. *: $P < 0.05$ vs. 70 mm, †: $P < 0.05$ vs. 100 mm).

Fig. 4-6 に第 2 章で開発した TEMP 混合 HPMC 膜を用いて, 紫外線ランプからの距離 70 mm と 140 mm における活性酸素曝露量測定結果の比較を示す. 140 mm と比較して紫外線ランプに近い 70 mm は ESR 強度が有意に高かった.

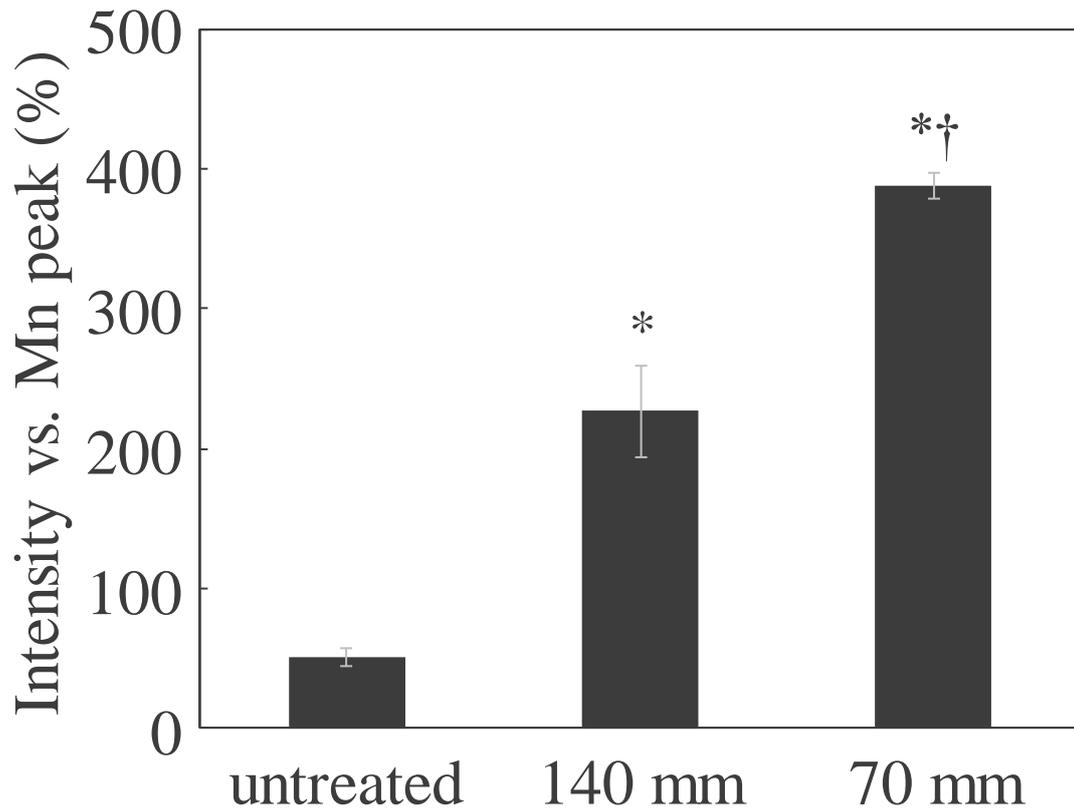


Fig. 4-6 紫外線ランプからの距離 70 mm と 140 mm における活性酸素曝露量の比較 (mean±SD; $n = 3$. *: $P < 0.05$ vs. untreated, †: $P < 0.05$ vs. 140 mm).

4.3.1.6. 紫外線ランプとの距離が表面改質効果に与える影響に関する考察

紫外線ランプと試料の距離を近づけることにより、PS 表面の元素組成やぬれ性の変化が顕著になった。紫外線の照度測定の結果から、紫外線ランプとの距離が近い 70 mm では、波長 185 nm および 254 nm の紫外線の照度が高く、140 mm では 70 mm と比較して、波長 254 nm の紫外線の照度が低下し、185 nm の紫外線が試料まで到達しなかった。また、ESR による活性酸素濃度測定の結果、紫外線ランプから遠い 140 mm と比較して 70 mm の ESR 強度が高かった。untreated でもわずかに TEMPOL が検知されたが、これは検知膜作製時の熱によって空気中の酸素と TEMP が反応したことに由来すると考えられる。一方、活性酸素曝露時の試料付近の温度は、紫外線ランプからの距離 140 mm の位置で最大 30°C、70 mm の位置で最大 37°C だった。これは検知膜作製時の温度よりも低いことから、untreated に見られたような熱による反応ではなく、140 mm と 70 mm の間に見られた検知量の差は、活性酸素の濃度差によって生じたものであるといえる。以上の結果から、試料を紫外線ランプに近づけることによって $^1\text{O}_2$ や紫外線照射によって $^1\text{O}_2$ を生成する O_3 濃度が高くなり、表面改質効果の向上に寄与したと考えられる。また、紫外線ランプに最も近い 70 mm でも表面粗さの変化が小さかったことから、活性酸素による表面改質は、表面粗さにおよぼす影響が小さく、元素組成の変化や官能基の付与といった化学的な作用による表面改質手法であることが示された。

XPS による表面元素組成解析結果および水の接触角測定結果より、TCPS と 70 mm は表面元素組成が同等である一方、算術平均粗さは約 1 nm、接触角は 25°程度異なった。一般的に表面粗さはぬれ性に影響をおよぼし、親水性表面では表面粗さが増加すると接触角が低下することが知られていることから、TCPS と 70 mm の間の表面粗さの差は接触角の差に影響を与えていると考えられる⁽⁴⁻¹⁰⁾。また、TCPS と 70 mm 表面の官能基や、化学構造の違いもぬれ性に影響を与えられる。各 PS 表面の C1s XPS スペクトルのピーク分離結果より、TCPS 上にはヒドロキシ基や C-O 結合が多く存在し、活性酸素に曝露した PS 表面はカルボキシ基や C=O 結合が多く存在した。Arima らはカルボキシ基とヒドロキシ基を形成した表面でぬれ性を比較した結果、ヒドロキシ基のほうが接触角の低下に影響すると報告している⁽⁴⁻¹⁾。以上より、TCPS 表面と活性酸素に曝露した PS 表面の官能基の種類の違いも、TCPS と活性酸素に曝露した PS のぬれ性の差に影響を与えていると考えられる。

4.3.1.7. 細胞培養試験結果

Fig. 4-7 に各 PS 表面上に播種した MC3T3-E1 の 24 時間培養後の SEM 像を示す。untreated 上の細胞はどれも細長い形状だった。140 mm では伸展した細胞が増加したが、一部 untreated のような繊維芽様の細胞が見られた。一方、100 mm と 70 mm では細長く伸展した細胞が見られず、TCPS に近い形状だった。

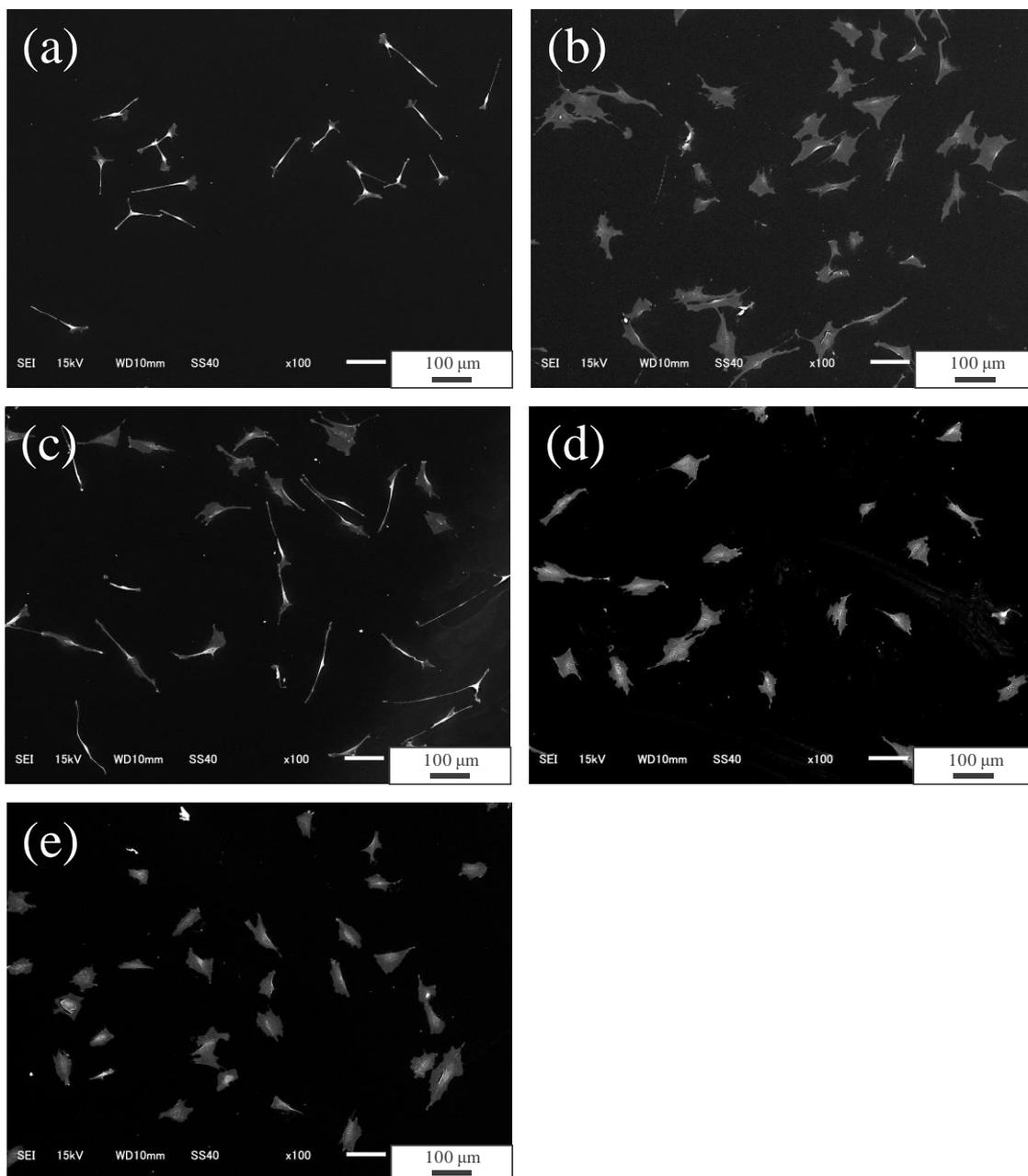


Fig. 4-7 各 PS 表面上に播種した MC3T3-E1 の 24 時間培養後の SEM 像.
(a) untreated, (b) TCPS, (c) 140 mm, (d) 100 mm, (e) 70 mm. Scale bar: 100 μm .

Fig. 4-8 に各 PS 表面上で 24 時間培養した後の MC3T3-E1 の接着細胞数を示す. untreated と比較して紫外線ランプと試料の距離が 100 mm および 70 mm の条件で接着細胞数が増加した. 紫外線と試料の距離が近づくと細胞接着数が増加する傾向がみられ, 70 mm は TCPS と同等に細胞が接着した.

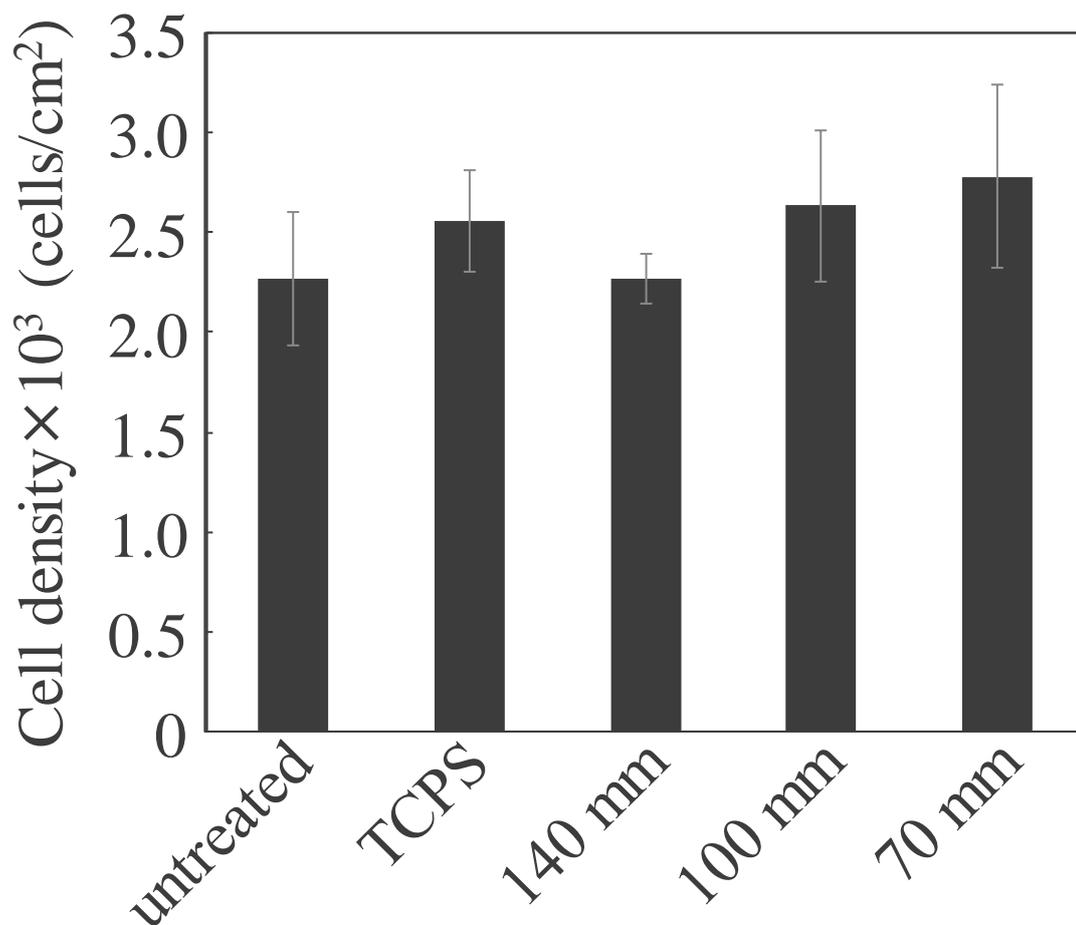


Fig. 4-8 各 PS 表面上で 24 時間培養した後の MC3T3-E1 の接着細胞数.

4.3.1.8. 表面改質効果が細胞接着性に与える影響に関する考察

各 PS 基板上で MC3T3-E1 を培養し, 表面特性に対する細胞の応答を評価した結果, 140 mm 上で培養した細胞は, untreated と比較して大きく伸展した細胞が増加したが, 繊維芽様の細胞も観察された. 一方, 100 mm と 70 mm 上で培養した細胞は, 140 mm と比較して細長く伸展した細胞が少なかった. TCPS, 100 mm, 70 mm のぬれ性はそれぞれ 36°, 67°, 61°であり, 値がそれぞれ異なることから, 細胞の初期接着にぬれ性は直接的には関与していないと推測される. 一方, XPS によって解析した TCPS, 100 mm, 70 mm の酸素割合はそれぞれ 10 at.%, 12 at.%, 12 at.%と比較的近い値を示したことから, 初期接着には表面の元素組成が大きく関わっており, この付近の元素組成が最適値であると推測される.

4.3.2. 活性酸素種曝露時間が PS 製細胞培養基板の表面改質効果に与える影響

4.3.2.項では4.3.1.項の結果より、最も細胞接着性が良好であった、紫外線ランプと試料の距離を 70 mm で固定し、活性酸素種曝露時間がポリスチレン製細胞培養基板の表面改質効果に与える影響を調査することにより、最適な活性酸素曝露条件を検討した。

4.3.2.1. 算術平均粗さ (R_a) の変化

Fig. 4-9 に活性酸素に曝露する時間を変更した PS 表面の算術平均粗さを示す。活性酸素に曝露した条件は untreated と比較して粗さに変化がなかった。長時間処理を行っても表面粗さに変化がないことから、活性酸素は表面粗さに変化をおよぼさない表面改質であると考えられる。

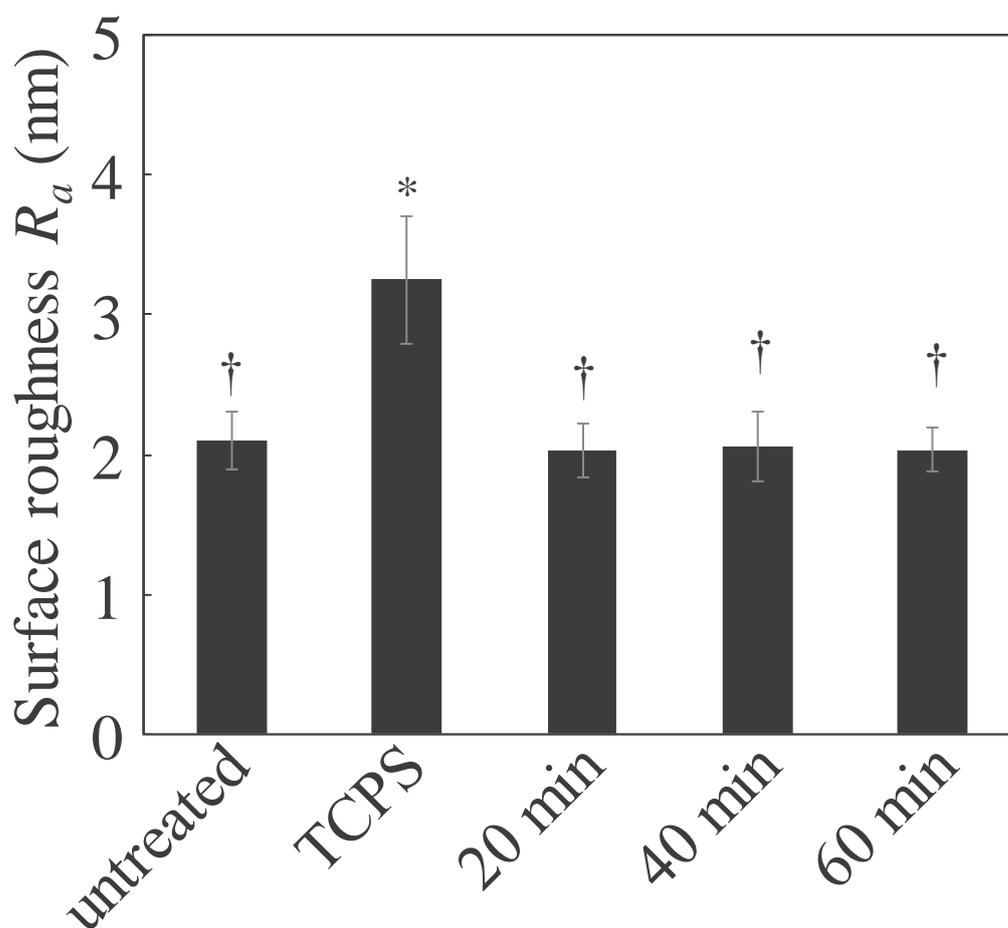


Fig. 4-9 活性酸素に曝露する時間を変更した PS 表面の算術平均粗さ (mean±SD; $n = 3$.
*: $P < 0.05$ vs. untreated, †: $P < 0.05$ vs. TCPS).

4.3.2.2. 表面元素組成の変化

Table 4-3 に活性酸素に曝露する時間を変更した PS 表面の表面元素組成比を示す。曝露時間の増加とともに酸素の割合が増加し、炭素の割合が減少した。曝露時間 40 分までは比例的に酸素の割合が変化し、曝露時間 40 分から 60 分、すなわち酸素の割合が 25 %を超えた段階で酸素割合の増加がなだらかになり、60 分間活性酸素に曝露した PS 基板の酸素割合は約 30%まで増加した。

Table 4-3 活性酸素に曝露する時間を変更した PS 表面の表面元素組成比.

	Carbon	Oxygen
untreated	99	1
TCPS	88	12
20 min	88	12
40 min	74	26
60 min	70	30

Atomic %

4.3.2.3. XPS スペクトルの変化

Fig. 4-10 に活性酸素に曝露する時間を変更した PS 表面の C1s XPS スペクトルを示す。20 min の C1s XPS スペクトルは、TCPS に近い形状を示すが比較的炭素と酸素の2重結合が多く存在することを 4.3.1. 項で明らかにした。60 min の C1s XPS スペクトルは、289~290 eV カルボキシ基を示すピークが増大し、285 eV 付近の C-C や C-H を示すピークが 20 min と比較して減少した。また untreated に見られた、291 eV 付近に見られるベンゼン環由来の $\pi \rightarrow \pi^*$ shake up ピークは 60 min の C1s XPS スペクトルでは見られなかった。この結果から、PS の側鎖にあるベンゼン環に対しても活性酸素は作用し、ベンゼン環に対して付加反応もしくは開環反応を起こしていると考えられる。

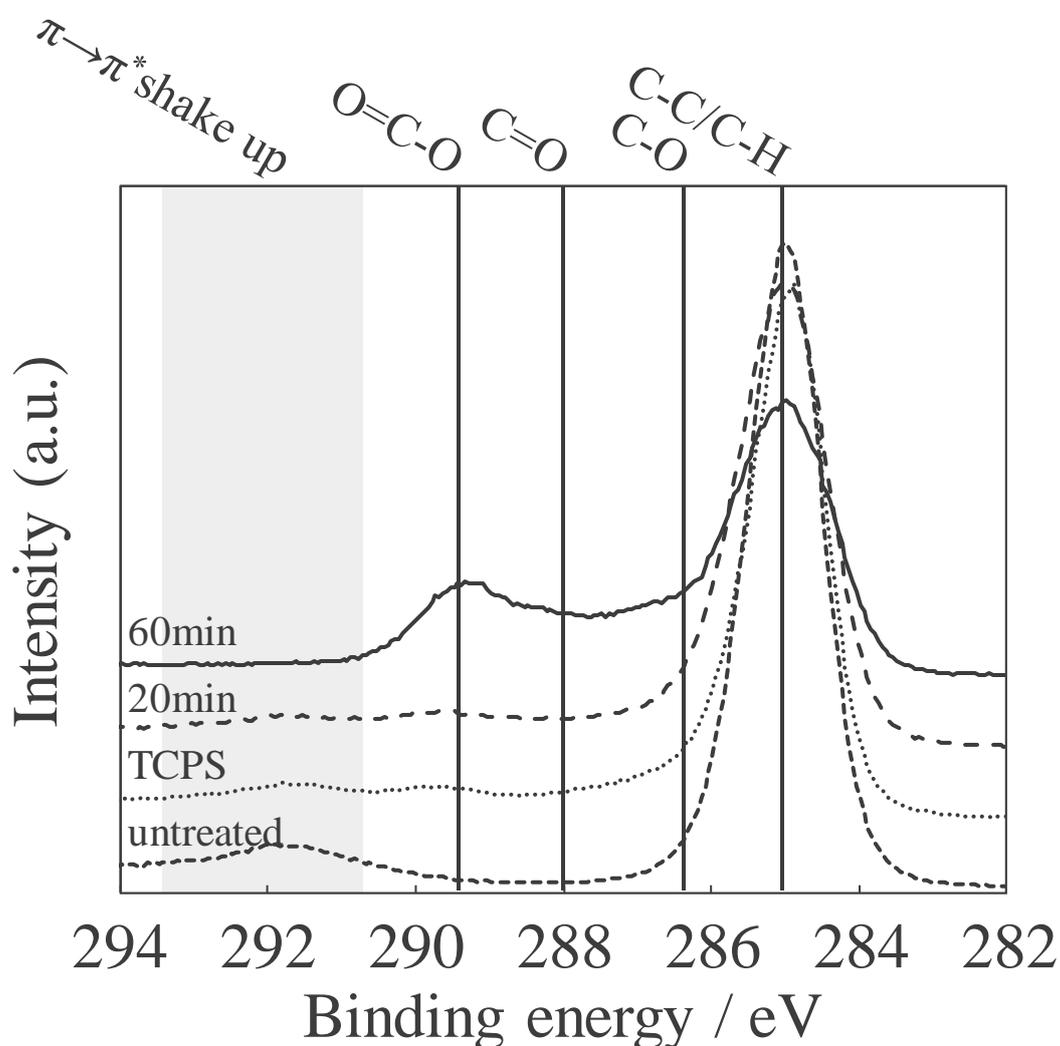


Fig. 4-10 活性酸素に曝露する時間を変更した PS 表面の C1s XPS スペクトル.

4.3.2.4. 表面元素組成と接触角の変化

Fig. 4-11 に XPS によって解析した表面の酸素割合と水の接触角の関係を示す。活性酸素によって表面改質を施した PS 表面の酸素割合と接触角は比例関係であった。60 分間活性酸素に曝露した PS 製細胞培養基板表面の接触角は 38°まで低下し、TCPS の接触角と近い値を示した。TCPS は活性酸素によって改質した表面の酸素割合と接触角の関係に見られた傾向とは異なり、比較的少ない表面酸素割合でも接触角が顕著に低下した。以上の結果から、酸素プラズマ照射と活性酸素曝露によって PS 表面に形成される改質層は特性が異なること考えられる。

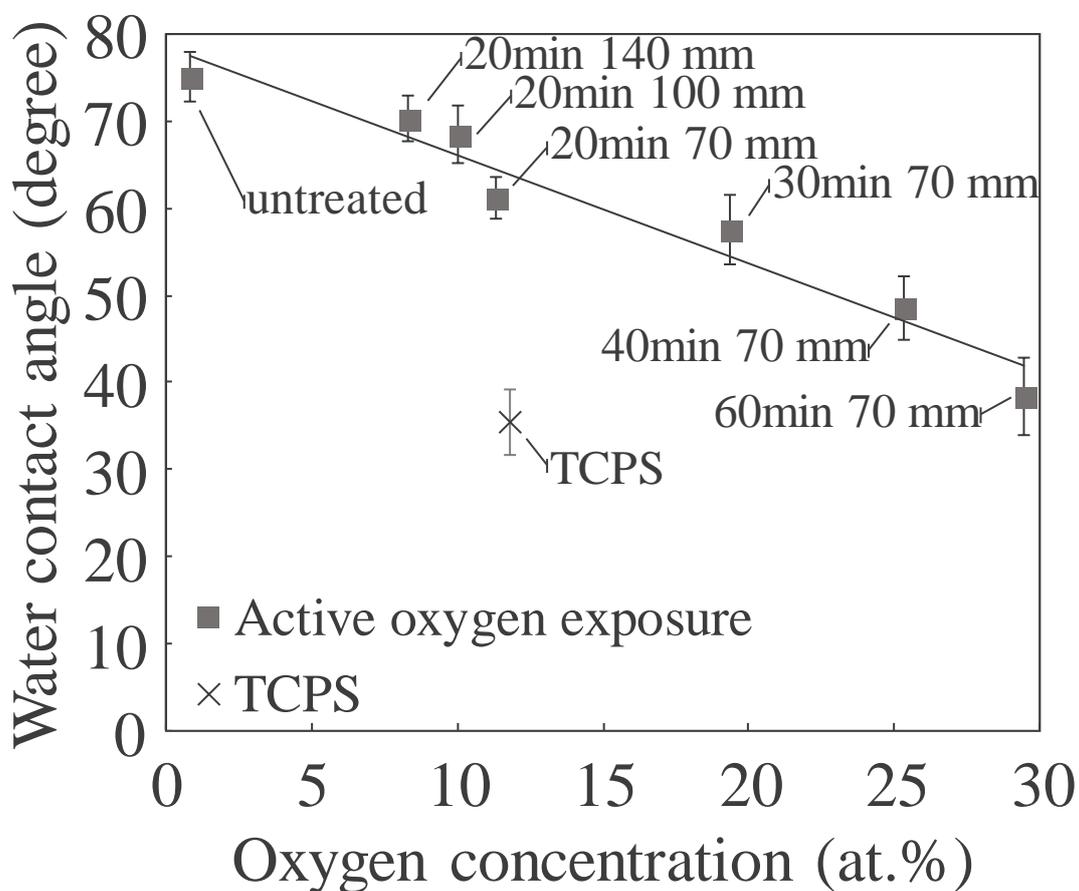


Fig. 4-11 活性酸素曝露前後の PS 表面の酸素割合と水の接触角の関係。

4.3.2.5. 角度分解 XPS による深さ方向解析

Fig. 4-12 に角度分解 XPS を用いた光電子放出角と元素組成比の関係を示す。放出角度が小さい条件ではより界面の情報のみ含み、放出角度の大きい条件では浅い領域から深い領域の情報も含む。活性酸素に曝露した PS 表面は放出角によって酸素割合に変化はなかった。一方、酸素プラズマ照射された TCPS は放出角が大きくなると酸素の割合が低下した。Paynter は酸素/アルゴンプラズマによって表面改質を施した PS の表面特性を AR-XPS によって評価した結果、20 Å 付近で急激に酸素割合が低下することを報告している⁽⁴⁻¹¹⁾。本研究で用いた酸素プラズマ照射が施された TCPS も同様の傾向を示したことから、酸素プラズマ照射が施された PS 特有の表面特性であると考えられる。

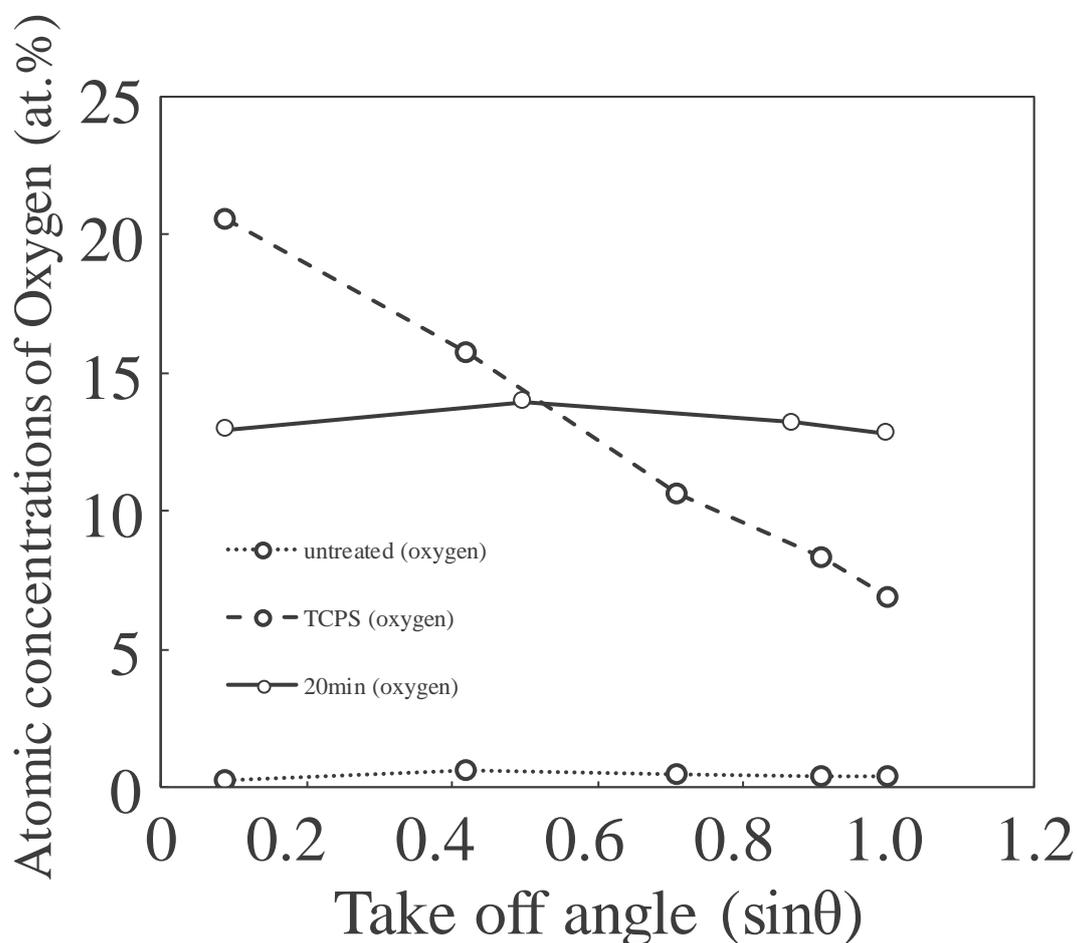


Fig. 4-12 角度分解 XPS を用いた光電子放出角と元素組成比の関係。

Fig. 4-13 に、以上の結果から予想される、活性酸素によって表面改質が施された PS 表面と TCPS の表面特性の違いの模式図を示す。活性酸素によって表面改質された PS 表面は酸素プラズマ照射が施された PS 表面と比較して深い領域まで酸素が導入され、TCPS はごく浅い領域のみ集中的に酸素が導入され、表面に露出する極性基密度高い状態であると考えられる。以上の結果から、活性酸素によって表面改質された PS 表面は、TCPS と同等の酸素割合にもかかわらず、界面に露出した極性基密度の違いによって接触角が異なると考えられる。

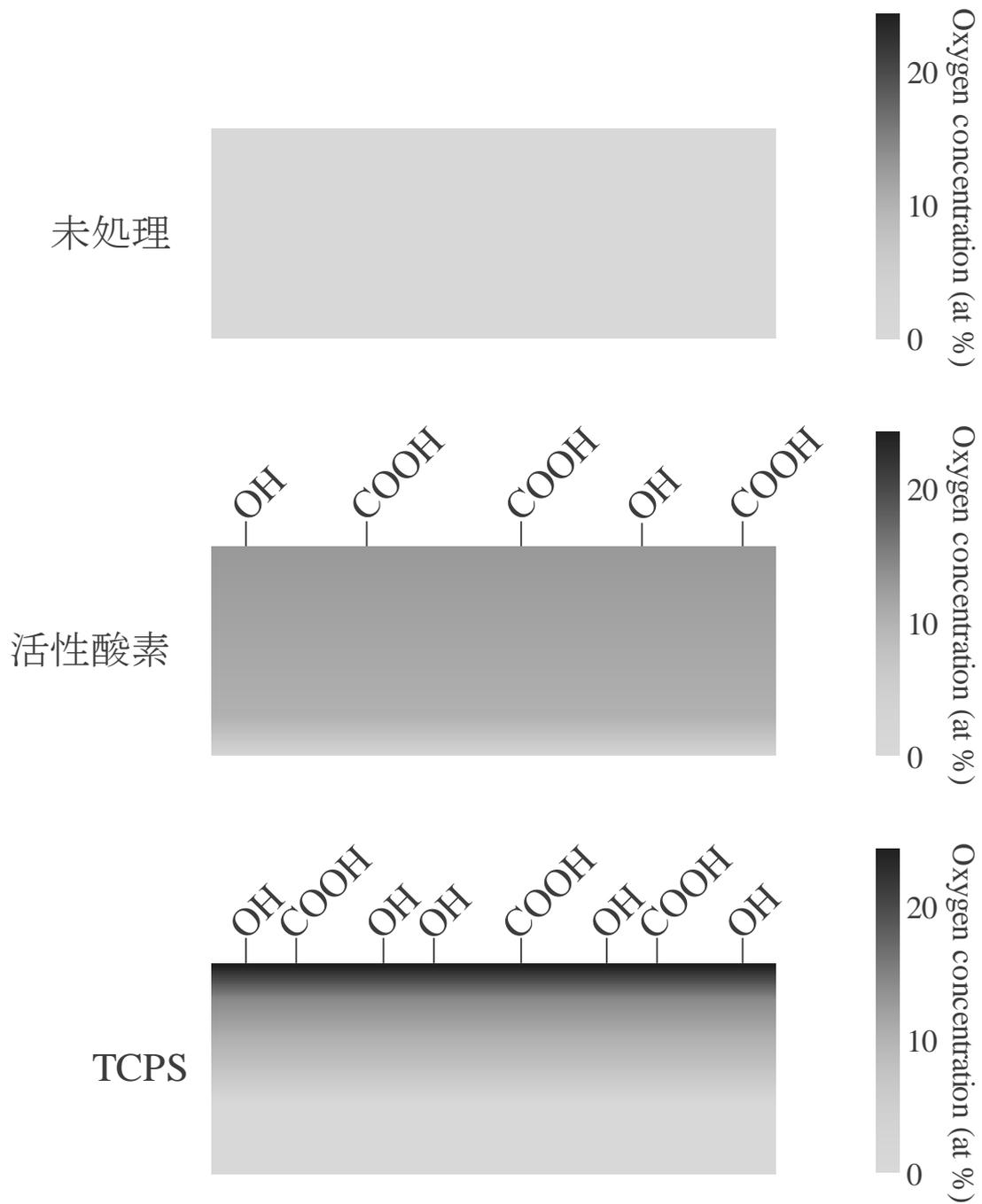


Fig. 4-13 活性酸素によって表面改質が施された PS 表面と TCPS の表面特性の違い.

4.3.2.6. 表面特性と細胞接着性の比較

Fig. 4-14 に各 PS 表面上に播種した MC3T3-E1 の 24 時間培養後の位相差顕微鏡像を示す。また、Fig. 4-15 に各 PS 表面上に播種した MC3T3-E1 の 24 時間培養後の SEM 像を示す。untreated 上の細胞はどれも細長い形状に伸展した。活性酸素に 40 分以上曝露した PS 基板上の細胞は、核を中心に等方的に伸展する円形に近い形状が多い傾向が見られ、20 min は比較的 TCPS に近い形状に伸展した。

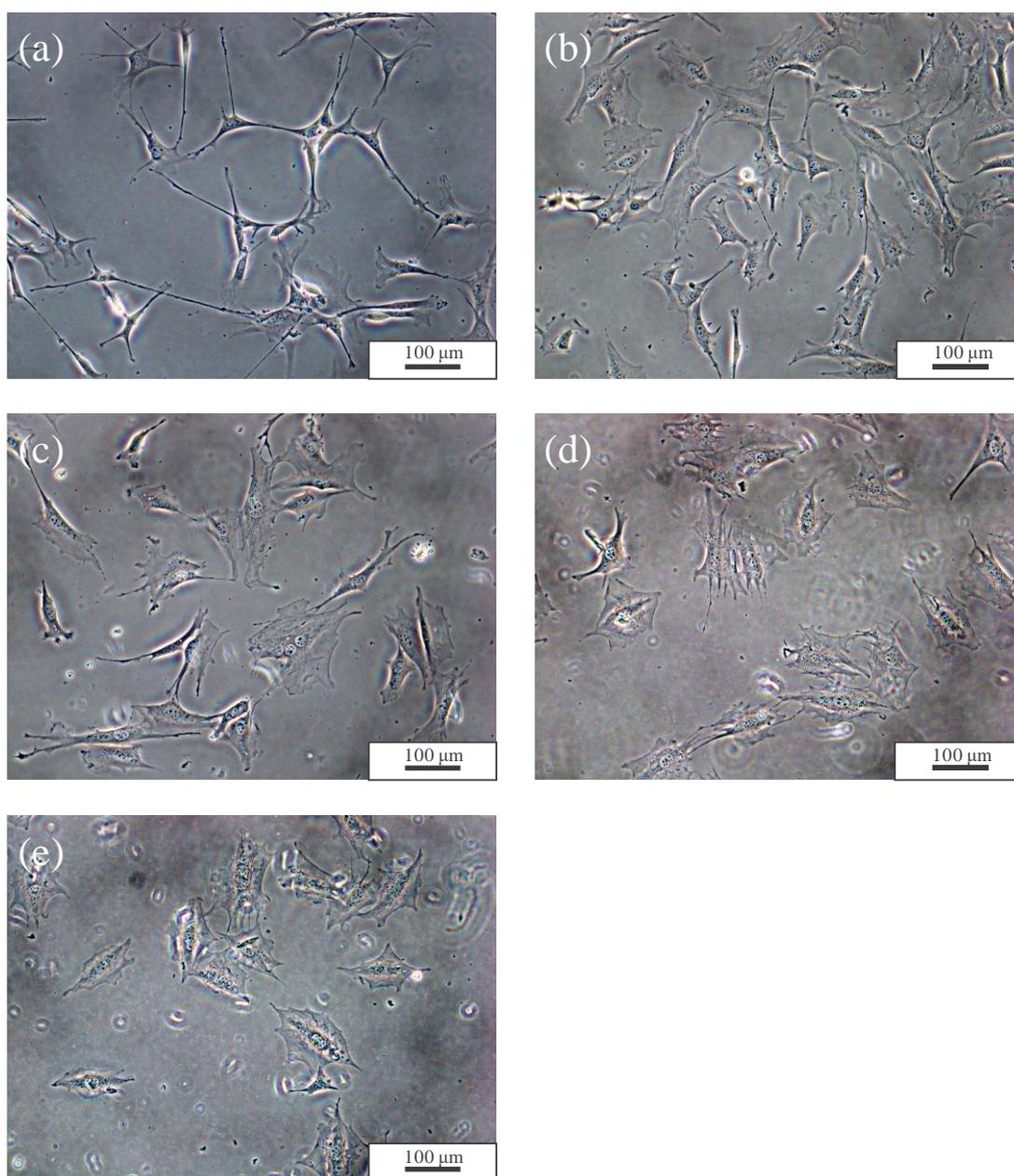


Fig. 4-14 各 PS 表面上に播種した MC3T3-E1 の 24 時間培養後の SEM 像。
(a) untreated, (b) TCPS, (c) 20 min, (d) 40 min, (e) 60 min. Scale bar: 100 μm.

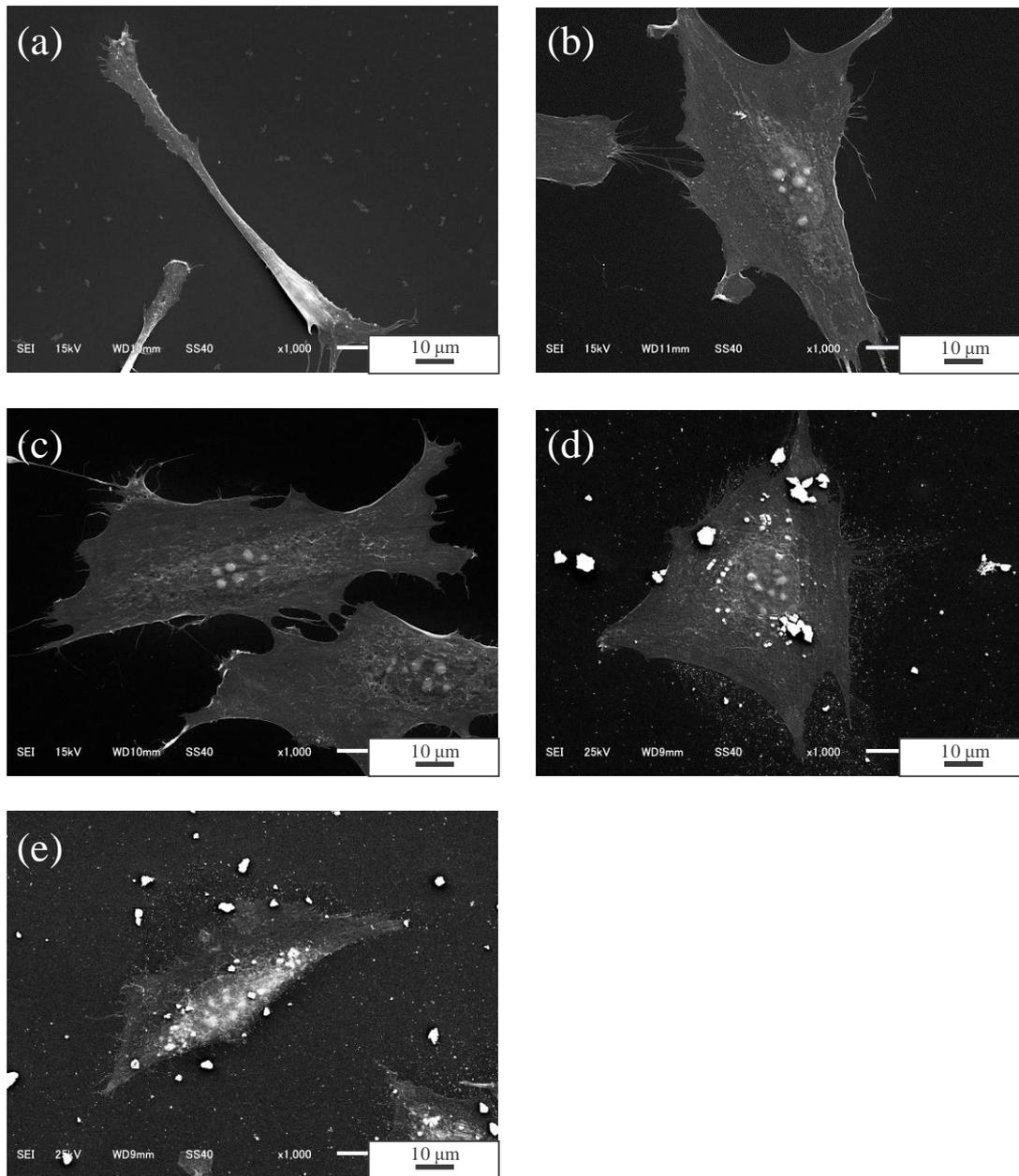


Fig. 4-15 各 PS 表面上に播種した MC3T3-E1 の 24 時間培養後の SEM 像.
 (a)untreated, (b)TCPS, (c)20min, (d)40min, (e)60min. Scale bar: 10μm.

Fig. 4-16 に活性酸素曝露前後の PS 上に播種した細胞の画像観察の結果をより定量的に評価するため、各 PS 上で 24 時間培養した MC3T3-E1 の細胞面積の平均の比較を示す. untreated の PS 上で培養した MC3T3-E1 は細胞の平均接着面積が約 $1300 \mu\text{m}^2$ であったのに対し、TCPS および活性酸素に曝露した PS 上で培養した MC3T3-E1 は平均し

て 2500~3000 μm^2 であった.

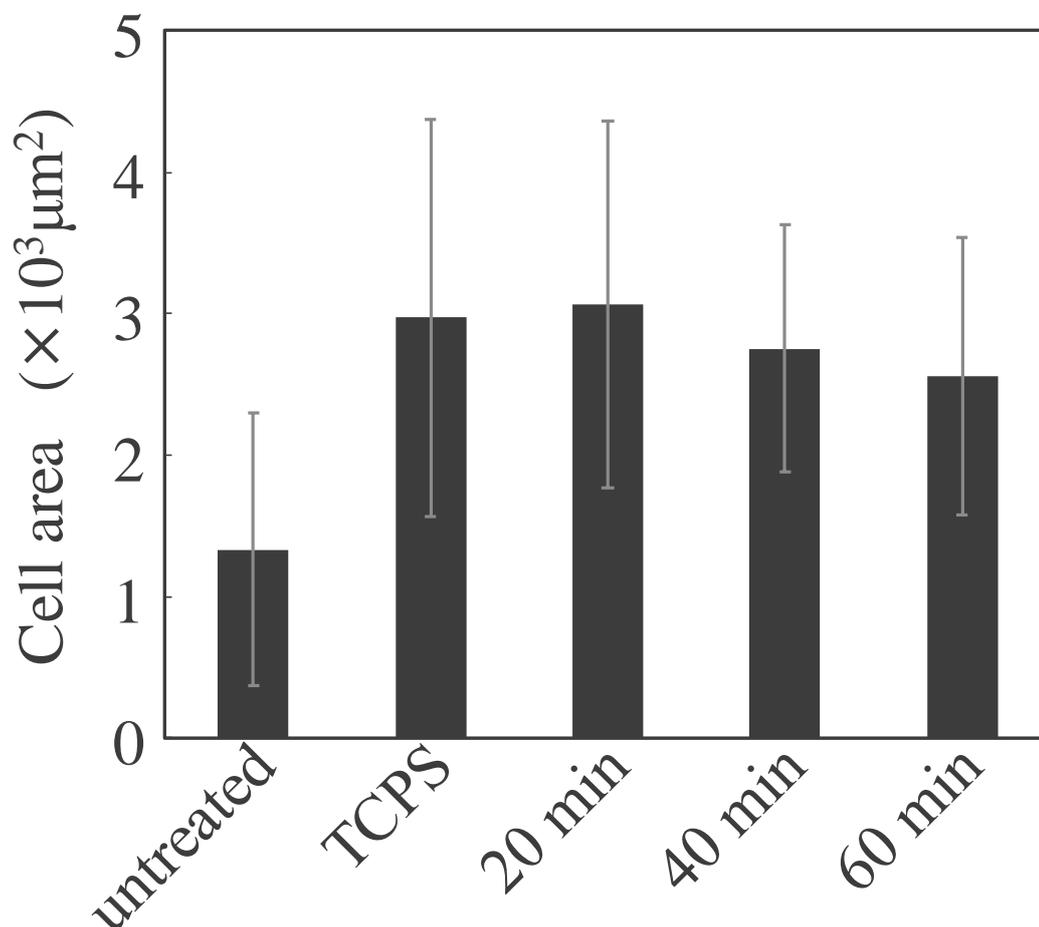


Fig. 4-16 各 PS 上で 24 時間培養した MC3T3-E1 の細胞面積の平均の比較.

より詳細に細胞の伸展形状を定量化するために、細胞の接着面積に閾値を設定し、接着した細胞の面積分布を比較した。Fig. 4-17 に各 PS 上で 24 時間培養した MC3T3-E1 の SEM 像から無作為に選択した 50 個の細胞の面積分布を示す。untreated は $1500 \mu\text{m}^2$ 以下の、細長く伸展した細胞が多く存在した。TCPS と 20 分間活性酸素に曝露した PS 上の細胞の面積は $1501 \sim 6000 \mu\text{m}^2$ の間に広く分布した。一方 40 分~60 分間活性酸素に曝露した PS 上の細胞の面積分布は曝露時間が延びるにつれて $1501 \sim 3000 \mu\text{m}^2$ にピークが表れ、活性酸素による表面改質が進むにつれて細胞の形態に変化が表れた。

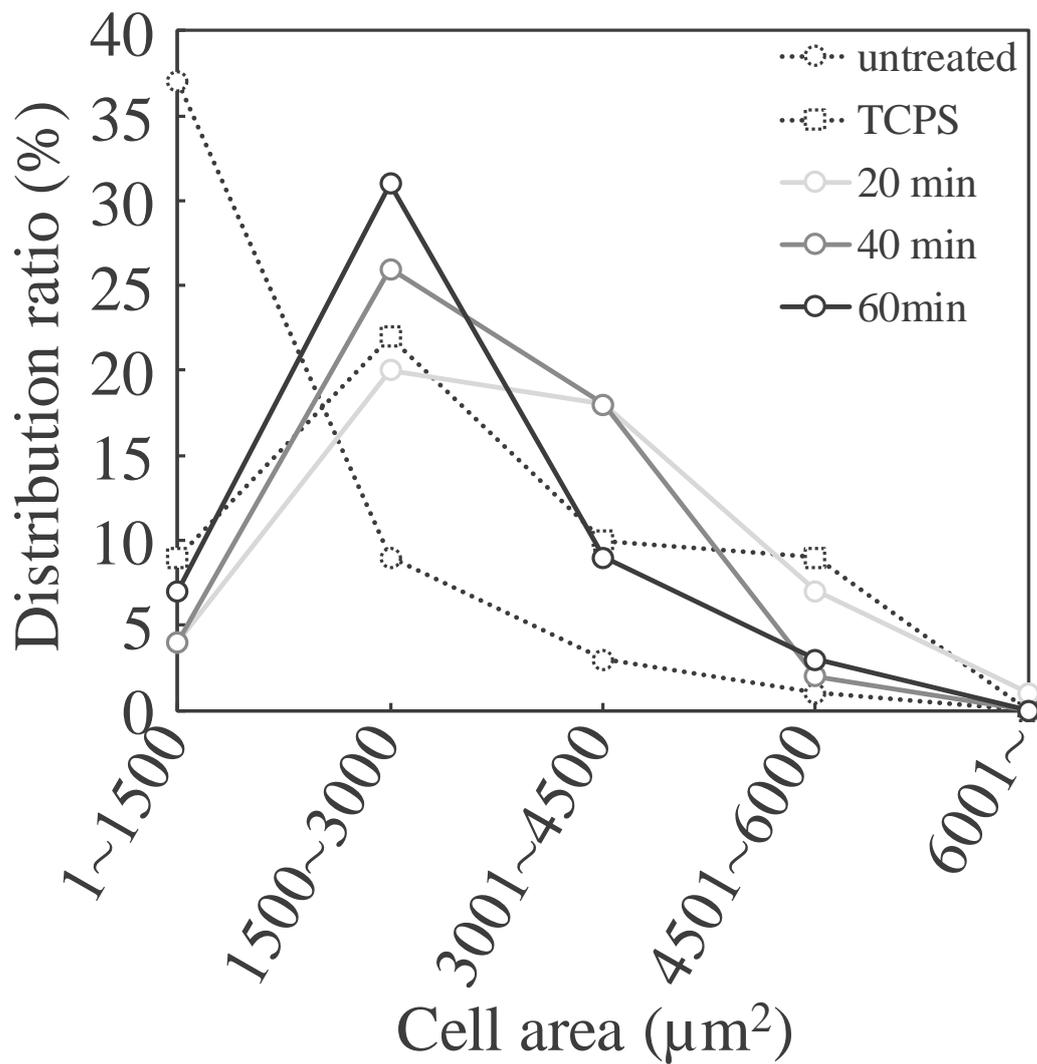


Fig. 4-17 各 PS 上で 24 時間培養した MC3T3-E1 の接着面積分布.

水の接触角が等しい TCPS と 60 分間活性酸素に曝露した PS 上の細胞の面積分布は違いが見られ、元素組成が近い TCPS と 20 分間活性酸素に曝露した PS 上の細胞の面積分布が近しかった。これらの結果から表面に露出する極性基密度または接触角は細胞の伸展性に直接的な影響をおよぼさず、表面の元素組成支配的であると考えられる。

TCPS と活性酸素に曝露した PS の表面特性の違いは、それぞれの表面改質メカニズムにも影響を受けると考えられる。TCPS の表面改質手法として採用されている酸素プラズマ照射は、イオンやラジカル、電子の照射によって物理的、化学的に表面特性を変化させ数秒から数分程度で接触角を 30°程度まで低下させる程の表面改質効果を得ることができる^{(44),(45)}。一方、活性酸素による表面改質は、紫外線によって生成した活性酸素雰囲気材料をさらす表面改質手法である。活性酸素生成に使用する紫外線は不織布製の滅菌バッグによってカットするため、酸素プラズマ照射と比較して、分子鎖の切断やラジカルの生成が少なく、表面に露出する親水性官能基の密度が低くなると考えられる。このような、改質メカニズムの違いも、TCPS のほうが活性酸素に曝露した PS と比較して接触角が小さくなった理由の一つであると考えられる。活性酸素に曝露した PS 表面は untreated 表面と比較して粗さの変化がなかったのに対し、高分子材料に対して酸素プラズマ照射を長時間行うと表面粗さが増加することが知られている⁽⁴⁹⁾。以上のことから、PS 表面の粗さに変化をおよぼさず、表面への酸素の導入やカルボキシ基を多く形成できる活性酸素による表面改質は、酸素プラズマ照射による表面改質とは異なる特性を有する表面を形成できる手法であるといえる。

4.4. 第4章のまとめ

本章では紫外線ランプと PS 製細胞培養基板の距離や活性酸素曝露時間といった活性酸素曝露条件を変更することによる表面改質効果に与える影響と、改質層の詳細な評価を行うことによって、活性酸素による PS の表面改質メカニズムを考察した。その結果活性酸素によって表面改質が施された PS 表面のぬれ性と酸素割合は相関関係にあった。AR-XPS によって活性酸素に曝露した PS 表面と酸素プラズマ照射が施された PS 表面を比較した結果、活性酸素に曝露した PS 表面は比較的深くまで均一に酸素が導入され、表面に露出する極性基の密度は比較的小さいことが明らかになった。また、活性酸素によって表面特性を制御した PS 表面の細胞接着性を比較した結果、PS 表面のぬれ性は細胞接着性に直接的な影響を及ぼさず、表面の元素組成が支配的に細胞接着性に影響を与えると示唆された。

第4章 参考文献

- (4-1) Y. Arima, and H. Iwata, Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers, *Biomaterials*, Vol. 28 (2007), pp. 3074-3082.
- (4-2) E. Martínez, E. Engel, Plamell, J.A. and Samitier, J., Effects of artificial micro- and nano-structured surfaces on cell behaviour, *Annals of ANATOMY*, Vol. 191 (2009), pp. 126-135.
- (4-3) W. A. Loesberg, J. te Riet, F. C. M. J. M. van Delft, P. Schön, C. G. Figdor, S. Speller, J. J. W. A. van Loon, X. F. Walboomers and J. A. Jansen, The threshold at which substrate nanogroove dimensions may influence fibroblast alignment and adhesion, *Biomaterials*, Vol. 28 (2007), pp. 3944-3951.
- (4-4) Y. Chen, Q. Gao, H. Wan, J. Yi, Y. Wei and P. Liu, Surface modification and biocompatible improvement of polystyrene film by Ar, O₂ and Ar + O₂ plasma, *Applied Surface Science*, Vol. 265 (2013), pp. 452-457.
- (4-5) H. Mirzadeh and S. Bagheri, Comparison of the effect of excimer laser irradiation and RF plasma treatment on polystyrene surface, *Radiation Physics and Chemistry*, Vol. 76 (2007), pp. 1435-1440.
- (4-6) A. S. Zeiger, B. Hinton and K. J. Van Vliet, Why the dish makes a difference: Quantitative comparison of polystyrene culture surfaces, *Acta Biomaterialia*, Vol. 9 (2013), pp. 7354-7361.
- (4-7) K. Hosoya, R. Wakayama, K. Oya and S. Iwamori, Polymer Surface Modification Due to Active Oxygen Species and Ultraviolet Light Exposures, *IEICE Transactions on Electronics*, Vol.E100-C, No.2 (2017), pp. 137-140.
- (4-8) B. Nisol and F. Reniers, Challenges in the characterization of plasma polymers using XPS, *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, Vol. 200 (2015), pp. 311-331.
- (4-9) A. Vesel, I. Junkar, U. Cvelbar, J. Kovac and M. Mozetic, Surface modification of polyester by oxygen- and nitrogen-plasma treatment, *Surface and Interface Analysis*, Vol. 40 (2008), pp. 1444-1453.
- (4-10) 今林信一郎, 固体表面のぬれ性に対する表面粗さの効果, *Review of Polarography*, Vol. 54, No. 2 (2008), pp. 115-121.
- (4-11) R. W. Paynter, Angle-resolved XPS study of the effect of x-radiation on the aging of polystyrene exposed to an oxygen/argon plasma, *Surface and Interface Analysis*, Vol. 33 (2002), pp. 14-22.

第 5 章

ポリジメチルシロキサンの表面改質効果の 安定性向上

5.1. 第5章の研究背景および目的

5.1.1. ポリジメチルシロキサン (PDMS) の細胞培養基板への応用について

第4章ではプラスチック製の細胞培養基板材料であるPSを供試材料、第5章ではシリコーンゴム材料であるPDMSの表面改質効果を検討した。

生体機能の解明や新薬の開発などの分野において、細胞培養基板上で培養した細胞に対する試験が行われている。一般的な細胞培養は、PS製の平面基板上で細胞を培養し、試験物質に対する細胞の応答が観察されるが⁽⁵⁻¹⁾、実際の生体内のような複数種の細胞の細胞間相互作用や、流れに対する応答性を調査することは困難である。PDMSは、無色透明、高いガス透過性、化学的安定性、耐熱性に優れるシリコーンゴムの一種であり、生体に対して不活性であることから、医療や生物研究分野においてフレキシブル材料として広く利用されている⁽⁵⁻²⁾⁻⁽⁵⁻⁴⁾。また成型性に優れており、PDMS上に形成した数百 μm の流路の中で細胞培養を行うことにより、生体内における細胞周囲の複雑で動的な微小環境を *in vitro* で再現する研究が行われている⁽⁵⁻⁵⁾⁻⁽⁵⁻⁷⁾。生体内を模擬したマイクロ流路内で細胞培養を行うことにより、培養細胞に本来の特異的性質を発揮させ、動物実験の代替技術として期待されている。

5.1.2. PDMS の細胞接着性向上を目的とした表面改質

PDMSは細胞接着性が乏しいため、表面改質を施すことによって細胞接着性を付与する必要がある。細胞接着性向上を目的としたPDMS製の表面改質は、細胞接着性タンパク質やコラーゲンをコーティングする手法が一般的に行われている^{(5-8),(5-9)}。しかし、表面自由エネルギーが小さいPDMSは皮膜性が悪く、細胞接着因子がはく離してしまうことが問題となっている。また、PDMS表面をプラズマ照射によって直接改質することにより、剥離を防止する表面改質が施されている⁽⁵⁻¹⁰⁾⁻⁽⁵⁻¹³⁾。プラズマ照射によって細胞接着性向上に必要な、表面に親水基の付与や、表面形状を変化させることができる。Bodasらは、PDMSにプラズマ照射を施すことによって表面に親水基であるヒドロキシ基が付与され、接触角が 120° から約 0° まで低下することを報告している。一方、処理後の時間経過とともにPDMSのフレキシブルな特性により、表面に露出した親水基が材料内部に移動することによって2週間後には接触角が 105° まで増加したことも報告している。また、プラズマ照射によってPDMS表面に2-ヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)をグラフト重合し、PDMSに対して親水性を有する分子鎖の長いポリマーを表面に植え付けることによって表面の分子の潜り込みを防ぎ、接触角の増加を抑制する試みがなされている⁽⁵⁻¹⁴⁾。直接的かつ安定的なPDMSの表面改質層を形成する手法が求められているが、煩雑な手法を用いる必要があり、より簡便かつ安定した表面改質手法が求められている。

UV/オゾン照射は、活性酸素生成に使用する紫外線を同時に試料に照射する手法であり、PDMSの親水性を向上させることが知られている。Berdichevskyらは、PDMSに

対して RF プラズマ照射および UV/オゾン照射を施し、FTIR や接触角測定によって表面改質効果を比較した結果、UV/オゾン照射は厚いシリコン酸化物層を表面に形成し、RF プラズマ照射と比較して表面改質後の時間経過によって接触角の増加が少なかったと報告している⁽⁵⁻¹⁵⁾。一方、UV/オゾン照射された PDMS 表面に対する細胞の接着性および、表面改質後の細胞接着性の持続性についての報告は皆無である。

5.1.3. 第 5 章の目的

第 5 章では、活性酸素と活性酸素生成に必要な紫外線の同時曝露による PDMS の表面改質効果を経時的に評価することにより、時間経過とともに変化しにくい PDMS の表面改質技術としての活性酸素および紫外線曝露の有用性を評価した。さらに、表面改質後の時間経過による細胞接着性を調査し、活性酸素および紫外線曝露による表面改質後の PDMS に対する細胞接着性の持続性と PDMS の表面特性の関係について考察した。

5.2. 実験方法・実験条件

5.2.1. 試料準備

PDMS は 2 液混合型の作製キット (SLYGARD184Kit, 東レ・ダウコーニング・シリコーン(株)) を使用した。基材と硬化剤を重量比 10:1 で混ぜたものを、直径 55 mm のポリスチレン製シャーレ内に流し入れて、65°C の恒温機 (DH 411, ヤマト科学) 内で 80 分間加熱して硬化させた。成膜した厚さ 0.9 ± 0.1 mm の PDMS を 10 mm 四方に切り、シャーレと接していた面を上にしてカバーガラス上に乗せた。

5.2.2. 活性酸素曝露方法

活性酸素生成および曝露は Fig. 2-2 に示した活性酸素生成装置を使用した。滅菌バッグに包装した試料を紫外線ランプからの距離 140 mm の位置に置いた。ロータリーポンプで大気を排気し、ピラニーゲージを確認しながら 2 kPa まで酸素を流入した。低圧水銀ランプを点灯し活性酸素および紫外線に試料を曝露した。曝露時間は 10 分間, 20 分間, 30 分間とし、曝露後のそれぞれの試料名を 10 min, 20 min, 30 min とした。

5.2.3. プラズマ照射方法

活性酸素および紫外線曝露の改質効果の比較対照として、高周波プラズマ装置 (RFS-200, ULVAC KIKO, Inc.) を用いて酸素プラズマ照射をおこなった。電極間距離を 65 mm, 到達真空度 13Pa とし、投入ガスを酸素, 操作圧力 100 Pa, 投入電力 200 W とし、酸素プラズマを発生させた。照射時間は 1 分間とし、照射後の試料名は plasma とした。

5.2.4. 白色干渉顕微鏡による表面粗さ測定方法

曝露前後の PDMS の表面形状は白色干渉顕微鏡 (BW-S507, 株式会社ニコンインステック) を用いて評価した。各曝露条件につき 3 試料ずつ用意し、レンズ倍率 50 倍、測定範囲 225 μm 四方として各試料 1 回ずつ表面の算術平均面粗さ (S_a) を測定し、その平均値から表面の面粗さを評価した。

5.2.5. 接触角測定方法

表面のぬれ性は水の接触角測定によって評価した。各条件 5 試料ずつ用意し、純水 5 μL を 10 mm の高さから滴下して PS 表面上の水滴を水平方向から撮影した。撮影した画像から、画像解析ソフト ImageJ (Ver.1.50i, アメリカ国立衛生研究所) を用いて水滴の高さ h とぬれ広がった水滴の半径 r を測定し、 $\theta/2$ 法 (式 4) より接触角を算出した。

$$\theta = 2 \tan^{-1} \frac{h}{r} \quad (3-1)$$

また、接触角が最も低下した PDMS 基板に対して、接触角の経時変化を測定した。デシケータ内にサンプルを保存し、改質後 2 週間にわたって接触角の測定を行った。プラズマを照射した PDMS も同様に保存し、活性酸素および紫外線曝露と比較することによって表面改質効果の安定性を評価した。

5.2.6. X 線光電子分光分析方法

曝露前後の PDMS 表面の化学状態および組成を X 線光電子分光 (XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy, PHI Quantera IITM, ULVAC-PHI Inc.) によって評価した。X 線源は、 $\text{AlK}\alpha$ 線を使用した。各試料に超高真空下で PDMS に X 線を照射し、光電効果により試料表面から放出された光電子を観測することによって C1s, O1s および Si2p の XPS スペクトルを得た。スペクトルの解析には、光電子分光分析ソフトウェア (PHI MultiPakTM Version 9, ULVAC-PHI Inc.) を使用した。C1s XPS スペクトルの極大ピークを 284.8 eV に合わせてチャージアップの補正をした後、シャーリー法によってバックグラウンドを処理した各スペクトル面積から元素組成を解析した。また、各スペクトルのケミカルシフトから、化学構造の変化を推定した。

5.2.7. 細胞培養評価方法

培養細胞は、マウス頭蓋冠由来骨芽細胞様細胞 (MC3T3-E1, 理化学研究所) を使用した。基本培地 (α -MEM, 1785552, Thermo Fisher Scientific K.K.) に濃度 10% になるようにウシ胎児血清を添加し、抗生物質・抗真菌剤 (100 U/mL penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

streptomycin, 0.25 µg/mL amphotericin B, 15240-062, Thermo Fisher Scientific K.K.) を添加したものを培養培地とした。活性酸素および紫外線曝露から 24 時間が経過した PDMS 基板を 3 試料ずつ用意して 70%エタノール 20 mL に 1 時間浸漬することによって滅菌し, PBS (-) (05913, 日水製薬) 溶液で静かに 3 回洗浄後, 未処理のポリスチレン製細胞培養基板 (Nunc™ Non-Treated Multidishes, Thermo Fisher Scientific K.K.) の well 内に各 PDMS 基板を設置した。各処理を施した PDMS 基板上と未処理の PDMS 基板 (以下 untreated) および一般的に細胞培養試験に使用されるプラズマ照射が施されたポリスチレン製組織培養基板 (Nunc™ Cell-Culture Treated Multidishes, Thermo Fisher Scientific K.K., 以後 TCPS) に対して, 細胞密度 5000 cells/cm² で細胞を播種し, 37°C, 二酸化炭素濃度 5%のインキュベーター内で 24 時間培養した。24 時間培養後の細胞は位相差顕微鏡 (IX-71, Olympus) を用いて撮影した。24 時間培養後の各 Well にセルカウニングキット (Cell Counting Kit-8, 株式会社同人化学研究所) を 100 µL ずつ添加して 2 時間培養後, マイクロプレートリーダー (SH-9000 Lab, CORONA ELECTRIC Co.,Ltd.) によって波長 450 nm の吸光度を測定した。別途, TCPS 上で培養し, 同様にセルカウニングキットを添加後に測定した吸光度と, 細胞をトリプシン処理によって回収してトリパンブルーで染色し, ビルケルチュルク血球計算板を用いてカウントした生細胞数によって検量線を作成し, 測定した吸光度と比較して 24 時間培養後の PDMS 上の生細胞数を測定した。

5.2.8. 有意差判定方法

活性酸素および紫外線曝露前後の上記評価系における変化を比較するために, 1 元配置分散分析を用いて有意差を判定し, 有意差を認めた場合は Tukey HSD 法による多重比較検定を, 統計解析ソフト SPSS (Version 23) 用いて行った。有意水準は 5%として, 多重比較検定の結果, untreated と有意差を認めた場合は”**, plasma と有意差を認めた場合は”**, TCPS と有意差を認めた場合は”†”, 活性酸素および紫外線曝露後の各条件間で有意差を認めた場合は”-”と表記した。

5.3. 実験結果および考察

5.3.1. 表面化学状態の変化

活性酸素および紫外線曝露と酸素プラズマ照射前後の PDMS 基板の表面元素組成比を Table 1 に示す. untreated と比較して, 表面改質前後で炭素の割合が減少し, 酸素の割合が増加した. 活性酸素および紫外線曝露時間を延ばすと, 炭素割合の減少と, 酸素割合の増加が顕著になった. 活性酸素および紫外線曝露は Si の割合は曝露前後および曝露時間によって変化しなかった. また, plasma のほうが炭素減少量に対する酸素導入量が少なかった.

Table 1 活性酸素および紫外線曝露前後の PDMS 基板の表面元素組成.

	C	O	Si
untreated	44	31	25
plasma	16	55	29
10 min	18	55	27
20 min	15	59	26
30 min	13	61	26

atomic %

活性酸素および紫外線曝露と酸素プラズマ照射前後の PDMS 基板の C1s XPS スペクトルを Fig. 5-1 に示す. untreated と比較して, 活性酸素および紫外線曝露後の各条件, plasma 共に, C-H 結合を示す 284.8 eV 付近の強度が減少した. 活性酸素および紫外線曝露後は, 曝露時間を延ばすことによって強度の減少が顕著になった. また, 20 min および 30 min は 286.5~290.0 eV 付近に現れる炭素と酸素の結合を示す領域の強度がわずかに増加した.

活性酸素および紫外線曝露と酸素プラズマ照射前後の PDMS 基板の O1s XPS スペクトルを Fig. 5-2 に示す. untreated と比較して, 表面改質後のピークトップが高エネルギー側にシフトし活性酸素および紫外線曝露時間を延ばすことによってピーク強度が増加した. plasma は活性酸素および紫外線曝露された PDMS と比較してシフト量が少なかった.

活性酸素および紫外線曝露前後の PDMS 基板の Si2p XPS スペクトルを Fig. 5-3 に示す. untreated の表面の Si2p XPS スペクトルは 102.5 eV 付近にピークトップがあらわれた. 一方 untreated と比較して, 活性酸素および紫外線曝露後は 102.5 eV 付近にピークが減少し, ピークトップが高エネルギー側にシフトした. また, 曝露時間を延ばすことによってシフト量が増加し, ピーク強度が増大した.

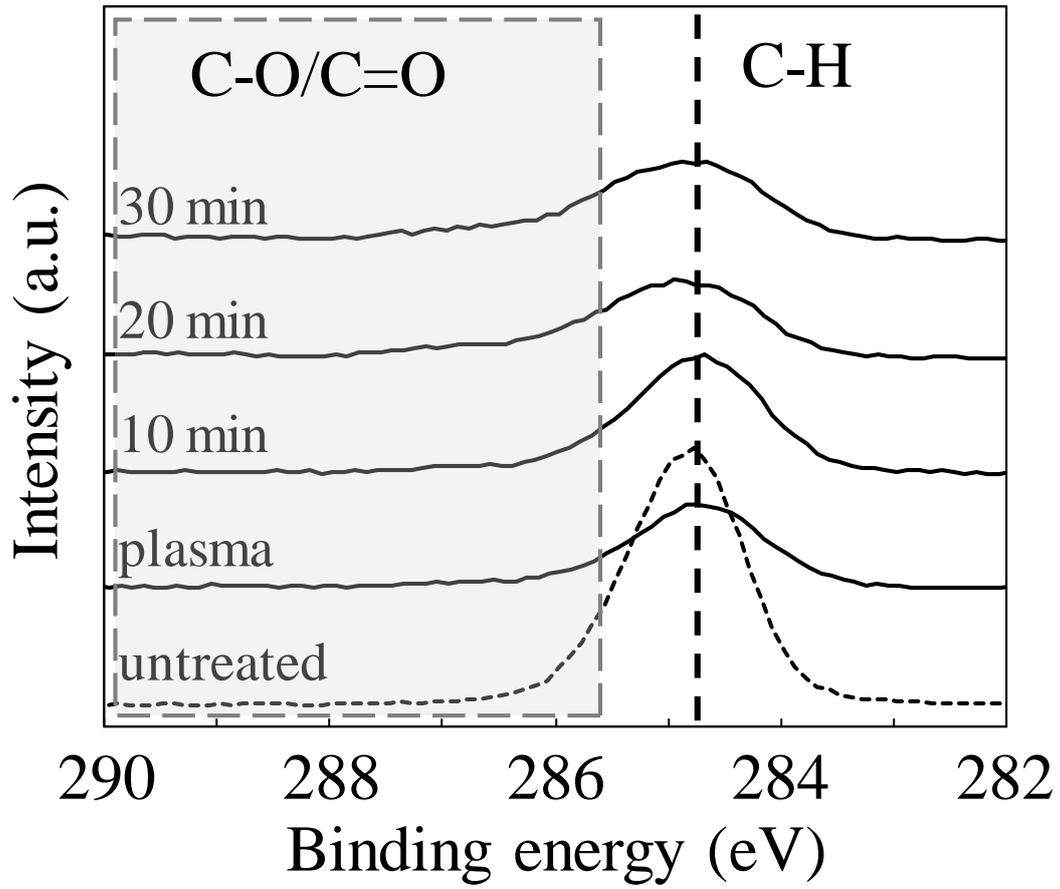


Fig. 5-1 活性酸素および紫外線曝露前後のPDMS基板のC1s XPSスペクトル.

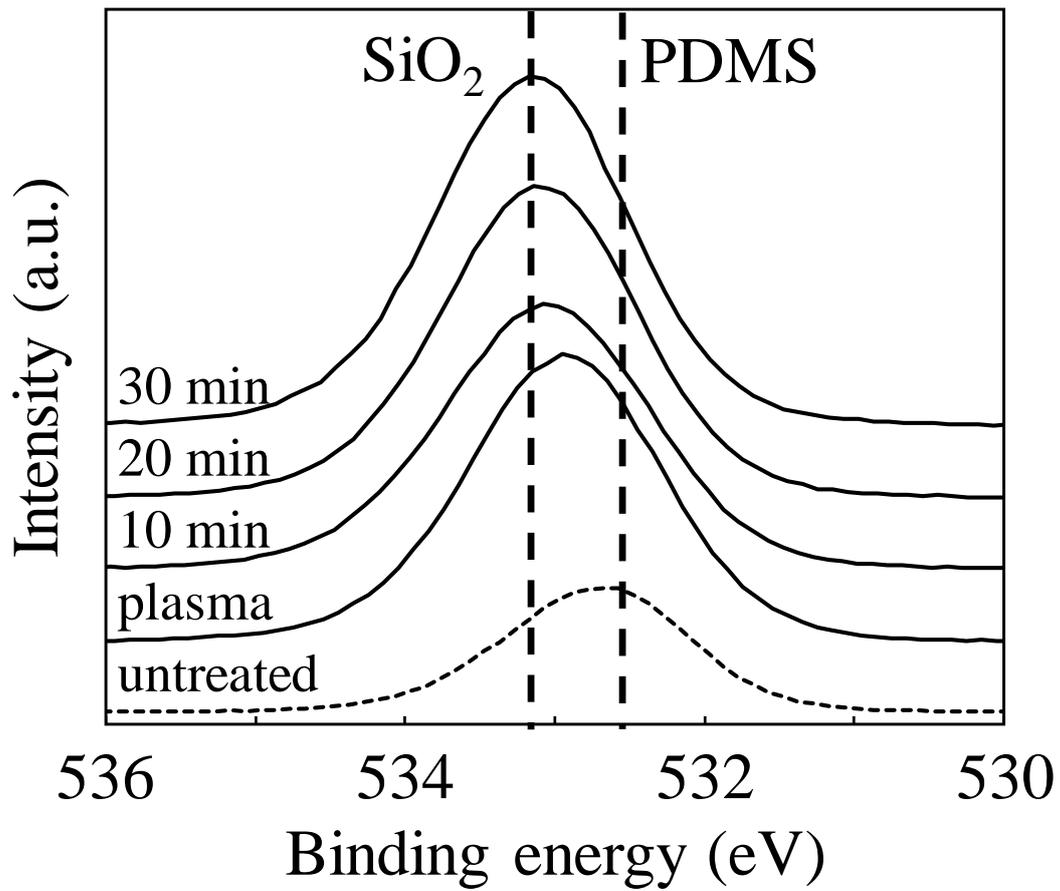


Fig. 5-2 活性酸素および紫外線曝露前後の PDMS 基板の O1s XPS スペクトル.

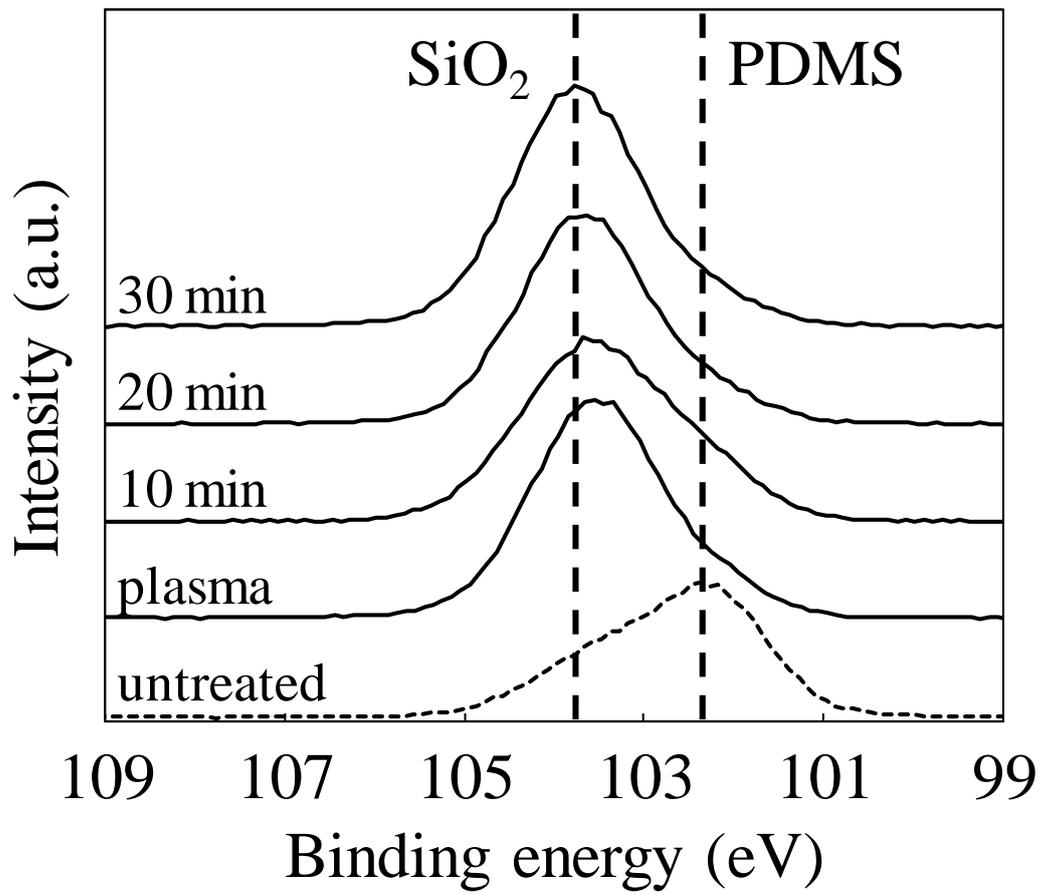


Fig. 5-3 活性酸素および紫外線曝露前後のPDMS基板のSi₂p XPSスペクトル.

5.3.2. 算術平均粗さ (S_a) の変化

白色干渉顕微鏡によって測定した、活性酸素および紫外線曝露と酸素プラズマ照射前後の PDMS 基板の算術平均粗さ S_a の測定結果を Fig. 5-4 に示す。曝露前後の表面粗さに有意差はなかった。

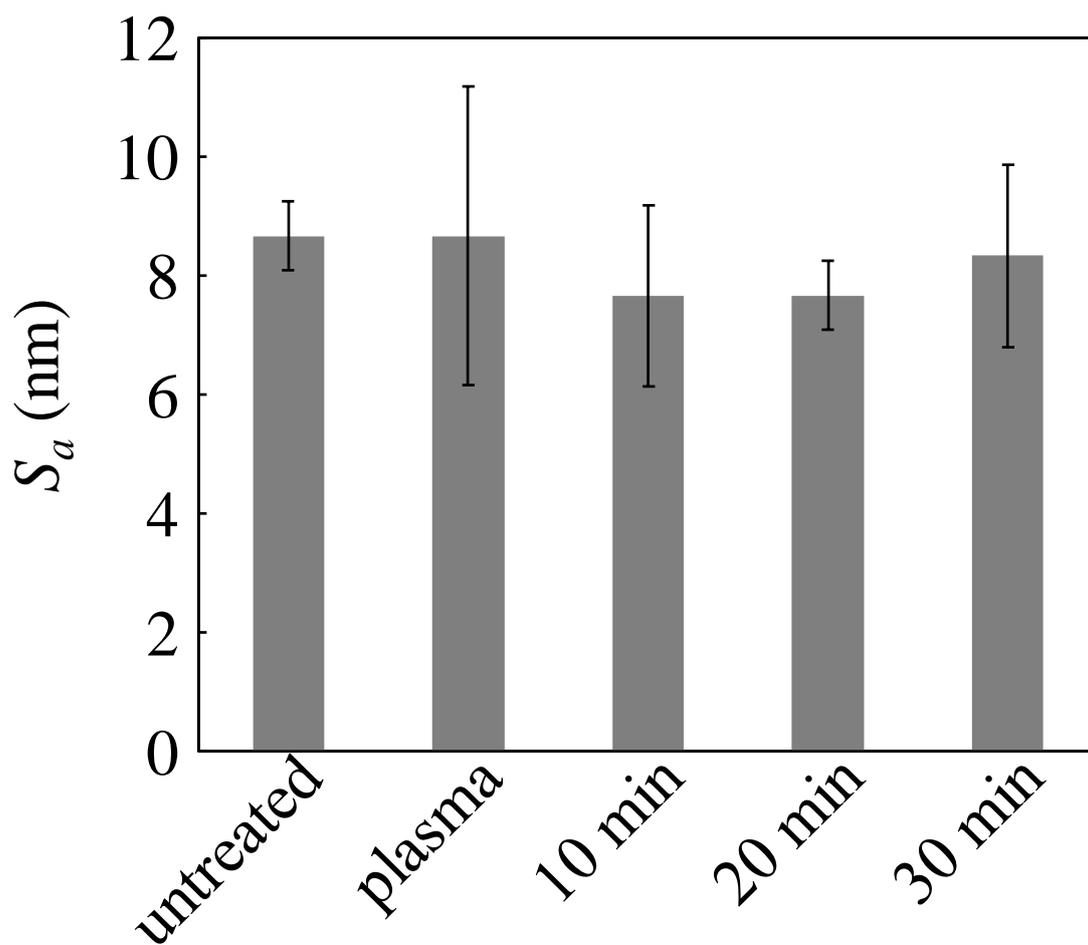


Fig. 5-4 活性酸素および紫外線曝露時間による PDMS の R_a の変化 (Mean \pm SD; $n=3$).

5.3.3. 接触角の変化

活性酸素および紫外線曝露および酸素プラズマ照射前後の PDMS 上の接触角測定結果を図 Fig. 5-5 に示す. untreated と比較して全ての曝露条件で接触角が有意に低下した. 曝露時間を延ばすと接触角がさらに低下し, 30 min は 17°であった. また plasma は 17°であった.

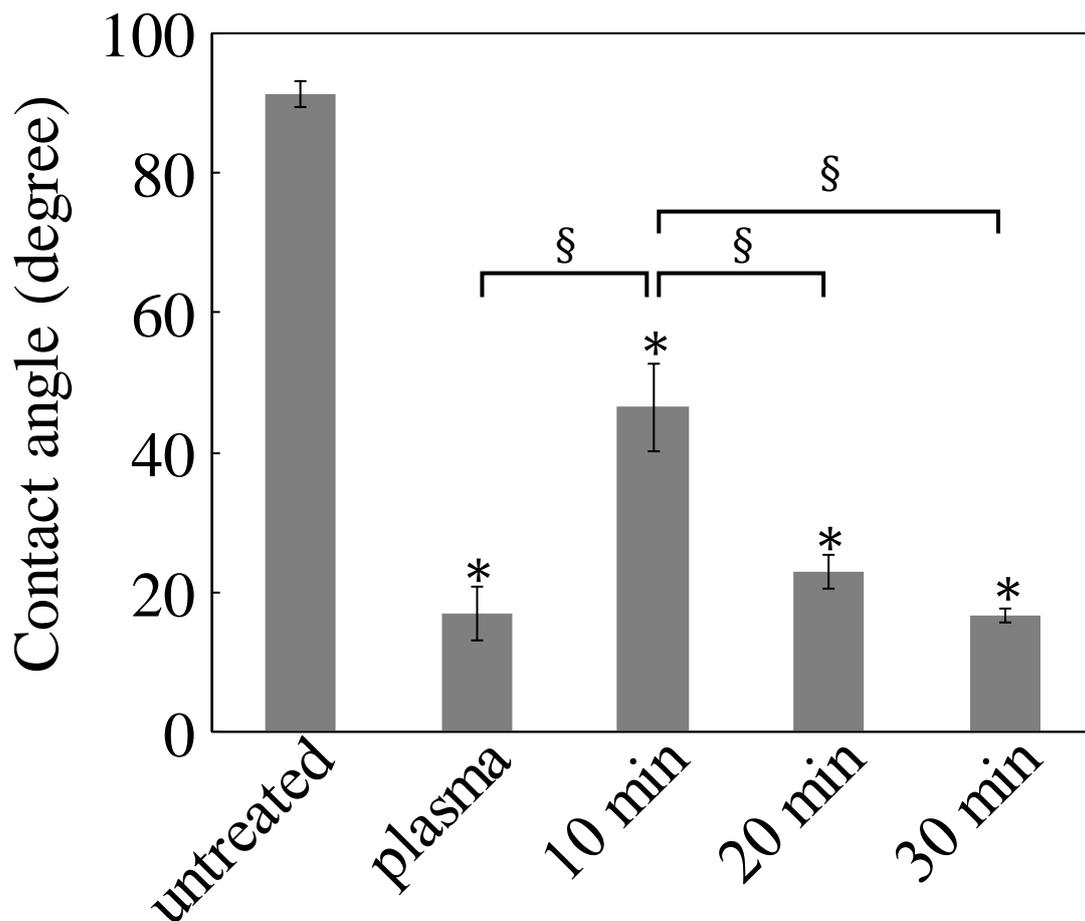


Fig. 5-5 活性酸素および紫外線曝露時間による PDMS の接触角の変化 (mean±SD; n = 3. *: $P < 0.05$ vs. untreated, §: $P < 0.05$).

5.3.4. 表面改質後の経過時間による XPS スペクトルの経時変化

30 min と plasma の表面改質前後の O1s XPS スペクトルの経時変化の測定結果を Fig. 5-6, Fig. 5-7 に示す. 30 min は処理後の時間経過とともにスペクトル形状に変化は見られなかった. 一方 plasma は処理後の時間経過とともに低エネルギー側の肩が膨らみスペクトル形状に変化が見られた.

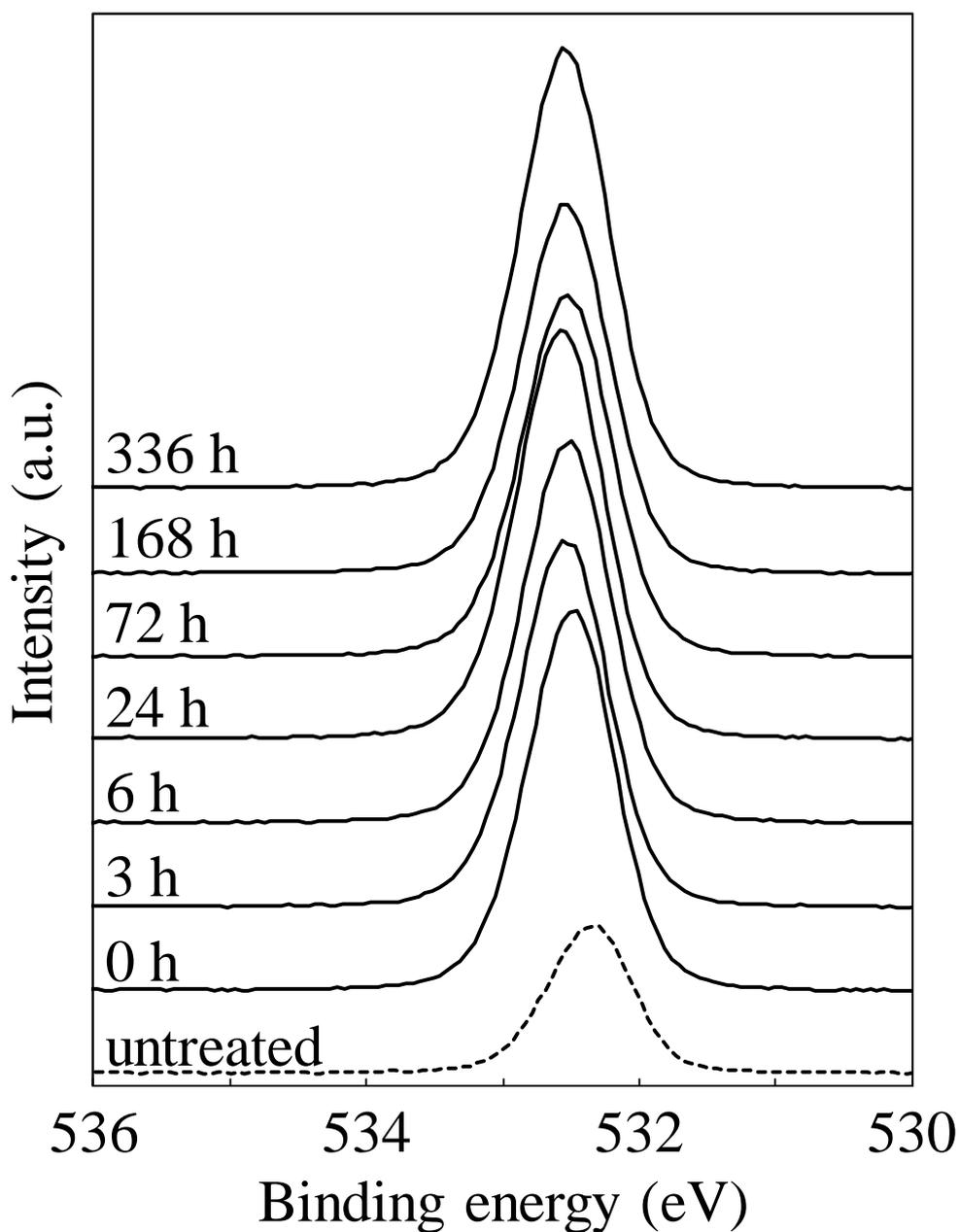


Fig. 5-6 活性酸素および紫外線 30 分間曝露後の経過時間による O1s XPS スペクトルの経時変化.

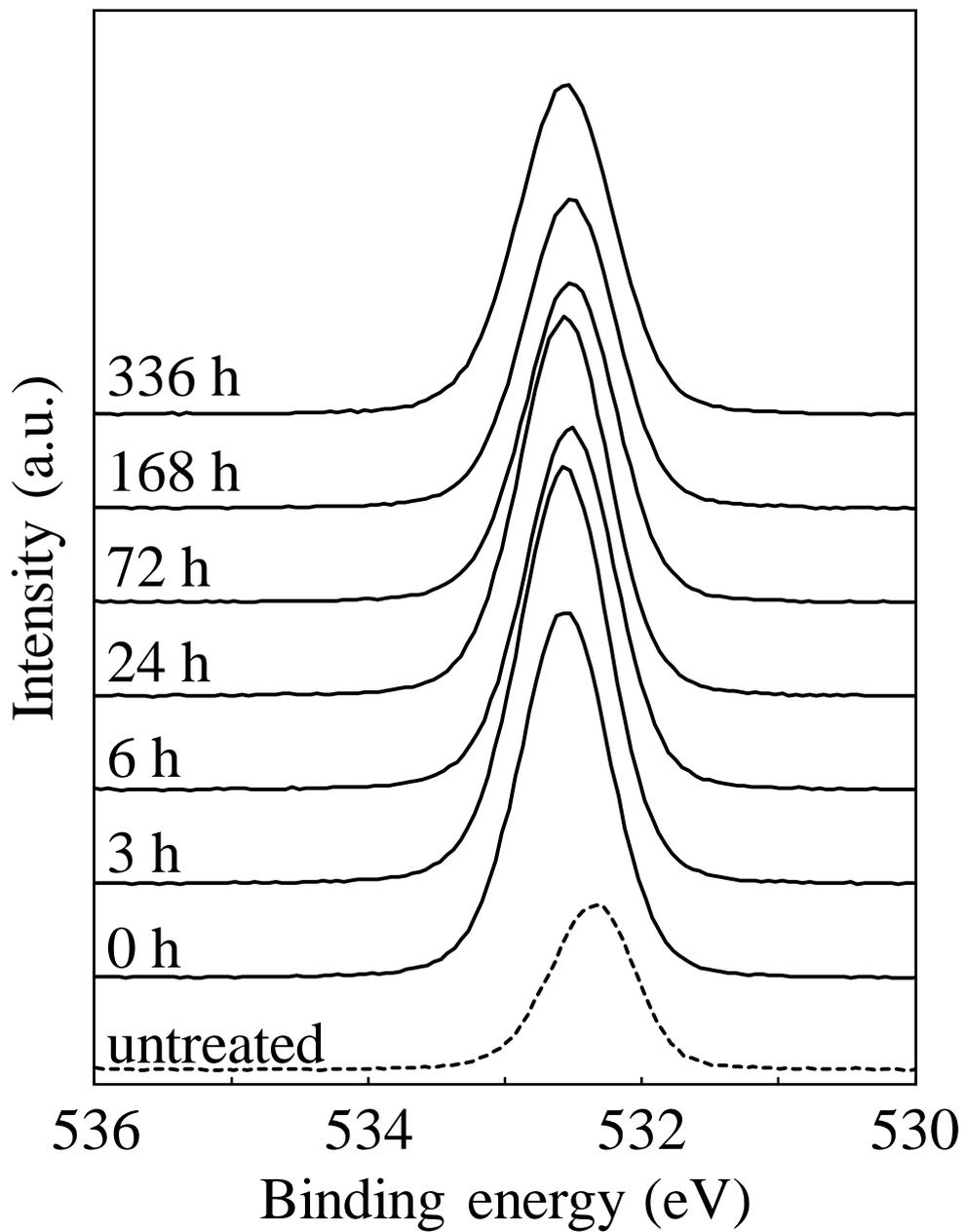


Fig. 5-7 酸素プラズマ照射後の経過時間による O1s XPS スペクトルの経時変化.

30 min と plasma の表面改質前後の Si2p XPS スペクトルの経時変化の測定結果を Fig. 5-8, Fig. 5-9 に示す. 30 min は処理後の時間経過とともに低エネルギー側の肩が膨らみ, スペクトル形状に変化が見られた. plasma も同様に処理後の時間経過とともに低エネルギー側の肩が膨らみ, スペクトル形状に変化が見られたが 30 min と比較して変化が顕著であった.

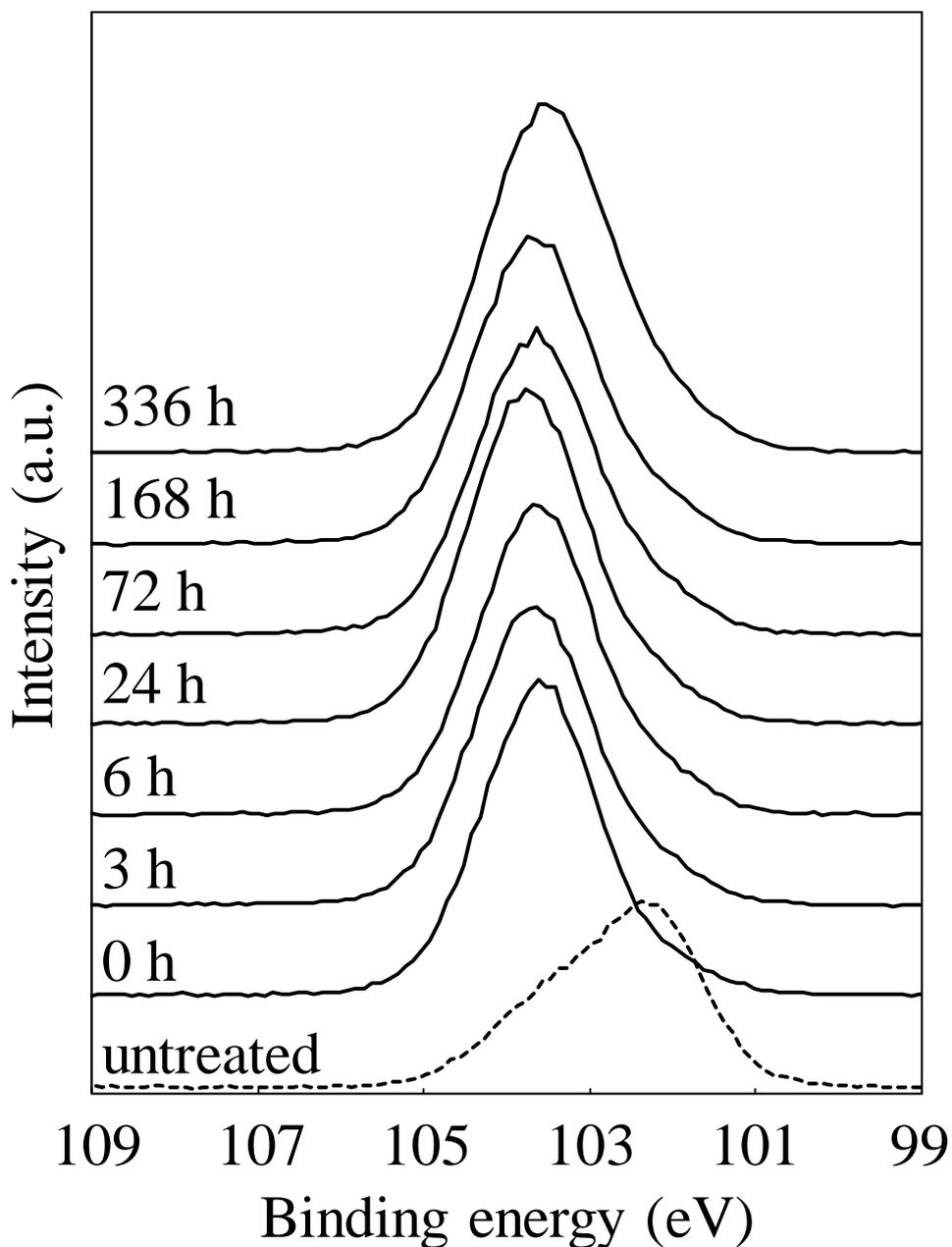


Fig. 5-8 活性酸素および紫外線 30 分間曝露後の経過時間による Si2p XPS スペクトルの経時変化.

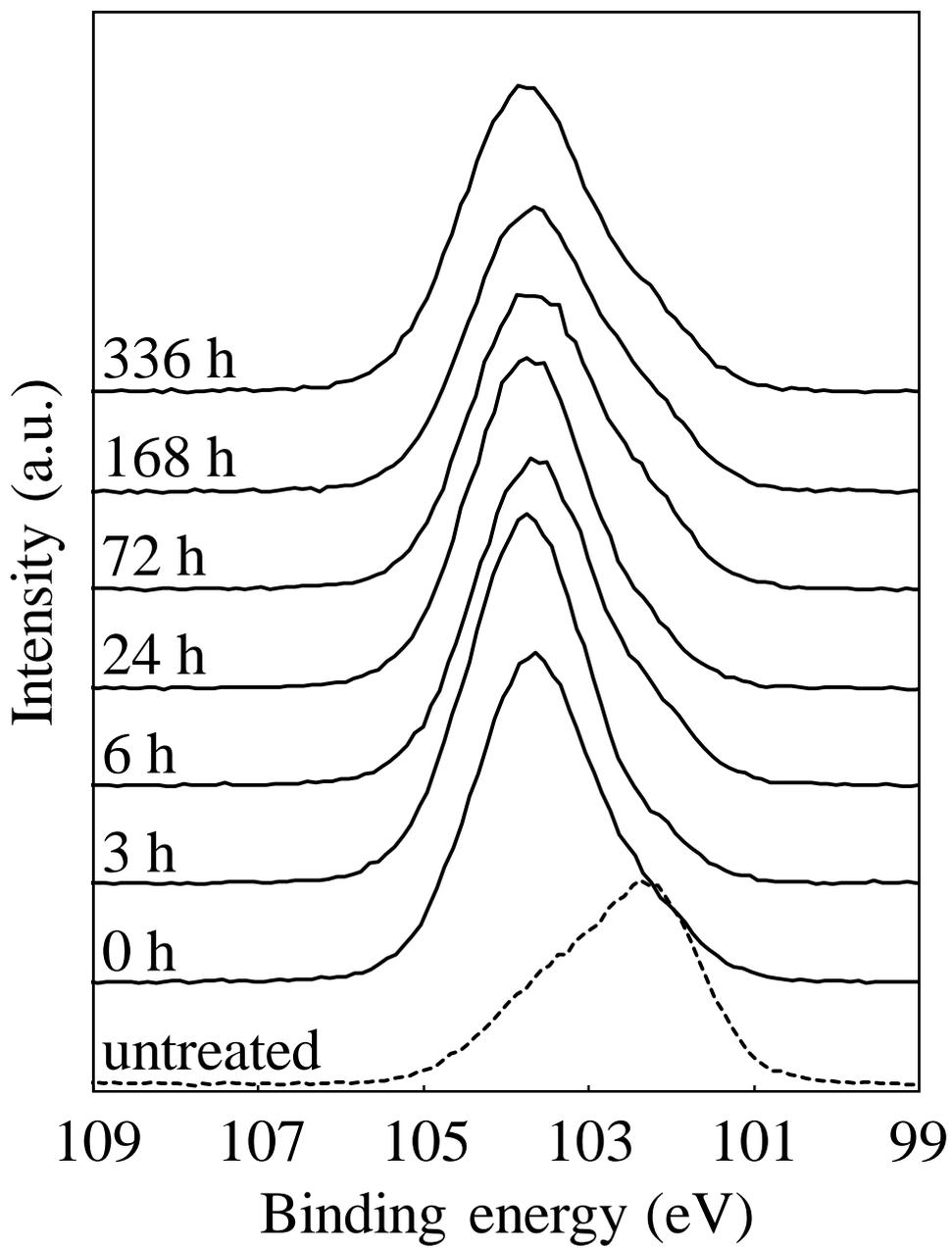


Fig. 5-9 酸素プラズマ照射後の経過時間による Si2p XPS スペクトルの経時変化.

5.3.5. 表面改質後の経過時間による接触角の経時変化

最も接触角が低下した 30 min と plasma の表面改質後の接触角の経時変化の測定結果を Fig. 5-10 に示す. plasma, 30 min 共に処理直後の接触角は 17°まで低下した. どちらの表面改質手法においても表面改質後の時間経過に伴って接触角が増加した. 336 時間後の plasma の接触角は 70°まで増加した一方, 30 min の接触角の増加は 55°までにとどまり, 活性酸素および紫外線曝露はプラズマ照射と比較して接触角の増加が抑制された.

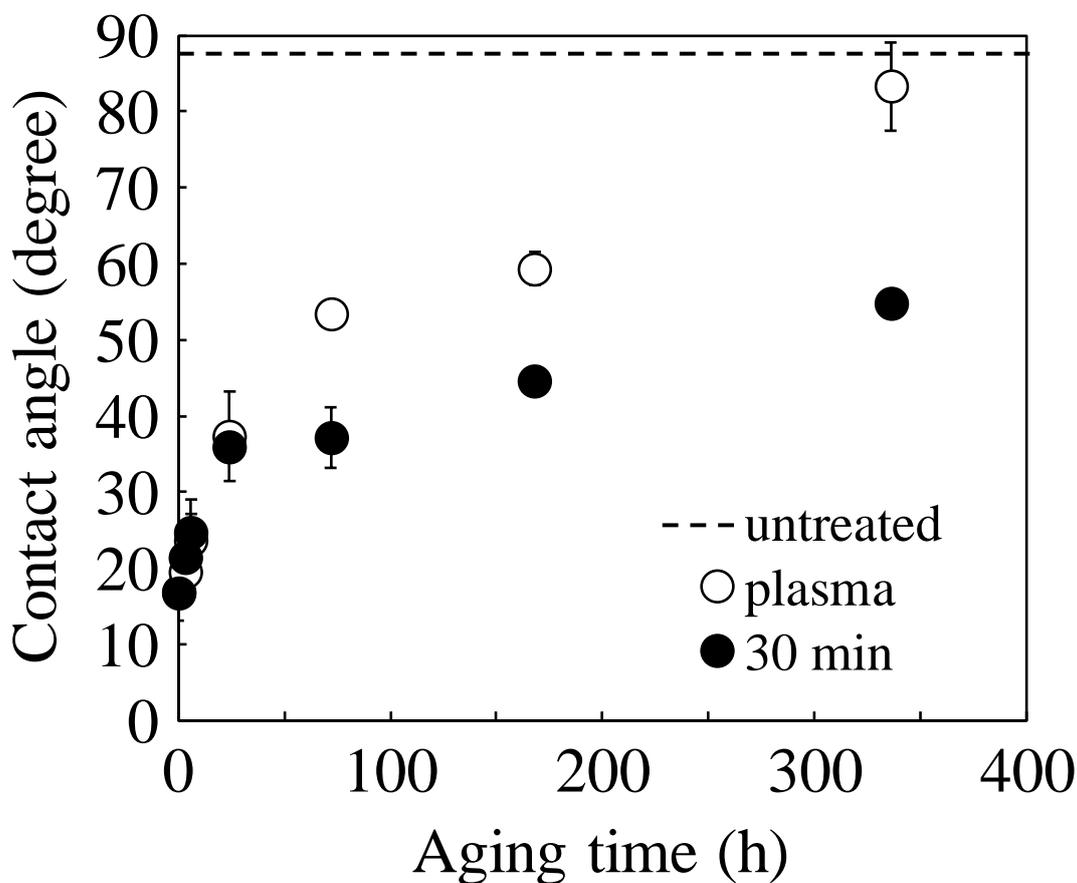


Fig. 5-10 活性酸素および紫外線 30 分間曝露と酸素プラズマ照射後の経過時間による接触角の経時変化 (mean±SD; n = 3).

5.3.6. 細胞培養評価結果

活性酸素および紫外線曝露 24 時間後と酸素プラズマ照射 24 時間後の PDMS 基板および untreated, TCPS に播種してから 24 時間後の位相差顕微鏡画像を Fig. 5-11 に示す. untreated は多くの細胞が細長く伸展した一方, 活性酸素および紫外線曝露後, 酸素プラズマ照射後共に細胞が広く伸展し, 細胞接着性が向上していることが観察された.

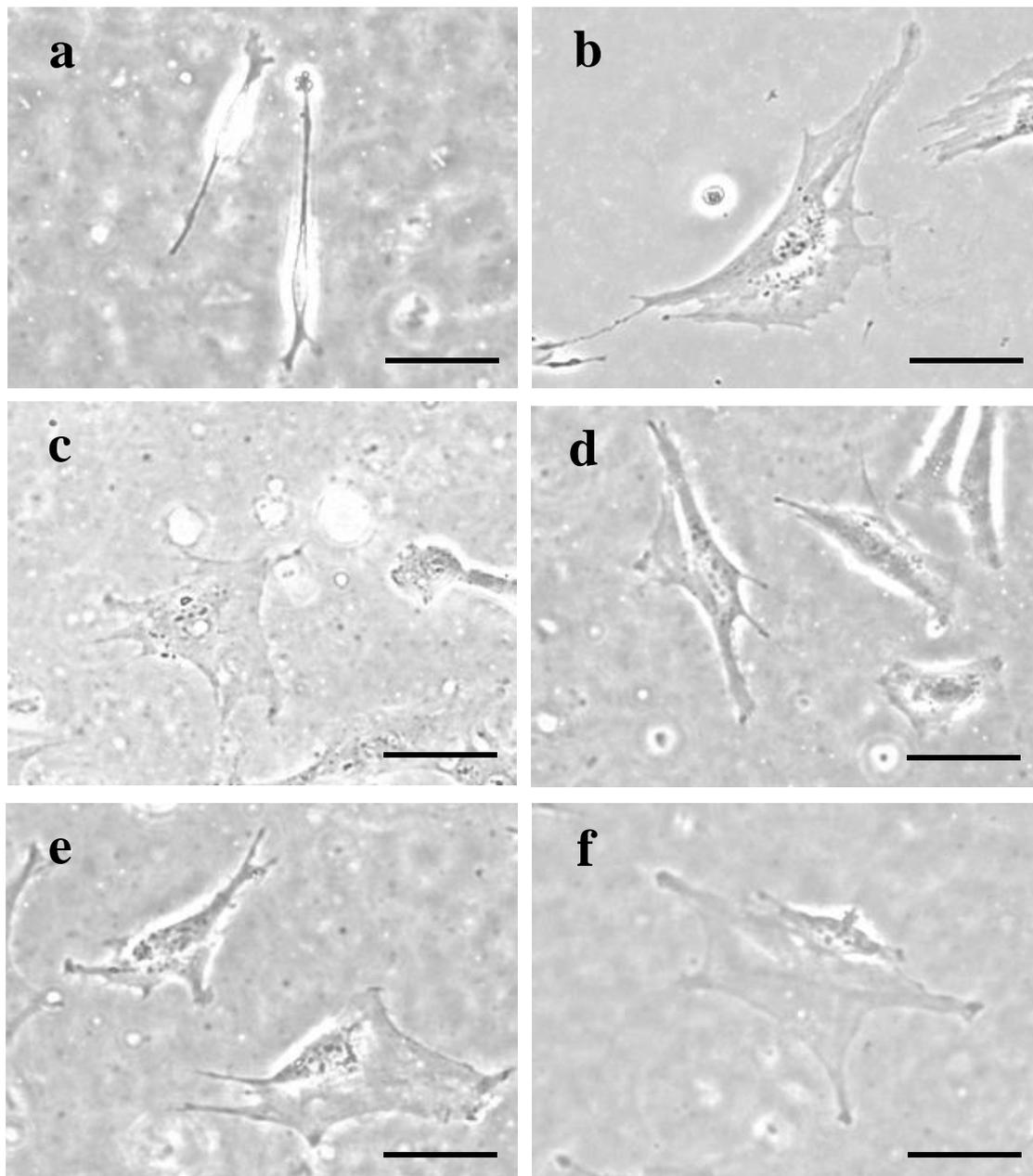


Fig. 5-11 活性酸素および紫外線曝露前後の PDMS 基板と TCPS に細胞を播種してから 24 時間後の位相差顕微鏡画像. (a) untreated, (b) TCPS, (c) plasma, (d) 10 min, (e) 20 min, (f) 30 min. (スケールバー: 50 μ m).

30 min と plasma の表面改質後の接着細胞数の経時変化の測定結果を Fig. 5-12 に示す。30 min, plasma 共に表面改質後 0 時間から 6 時間までの表面上の接着細胞数は untreated と有意な差が見られなかった。30 min は曝露後 24 時間以降で接着細胞数が増加した。plasma 上の細胞も 30 min 同様に照射後 24 時間で接着細胞数が増加したが、照射後 168 時間以降は untreated に近い接着細胞数まで低下した。

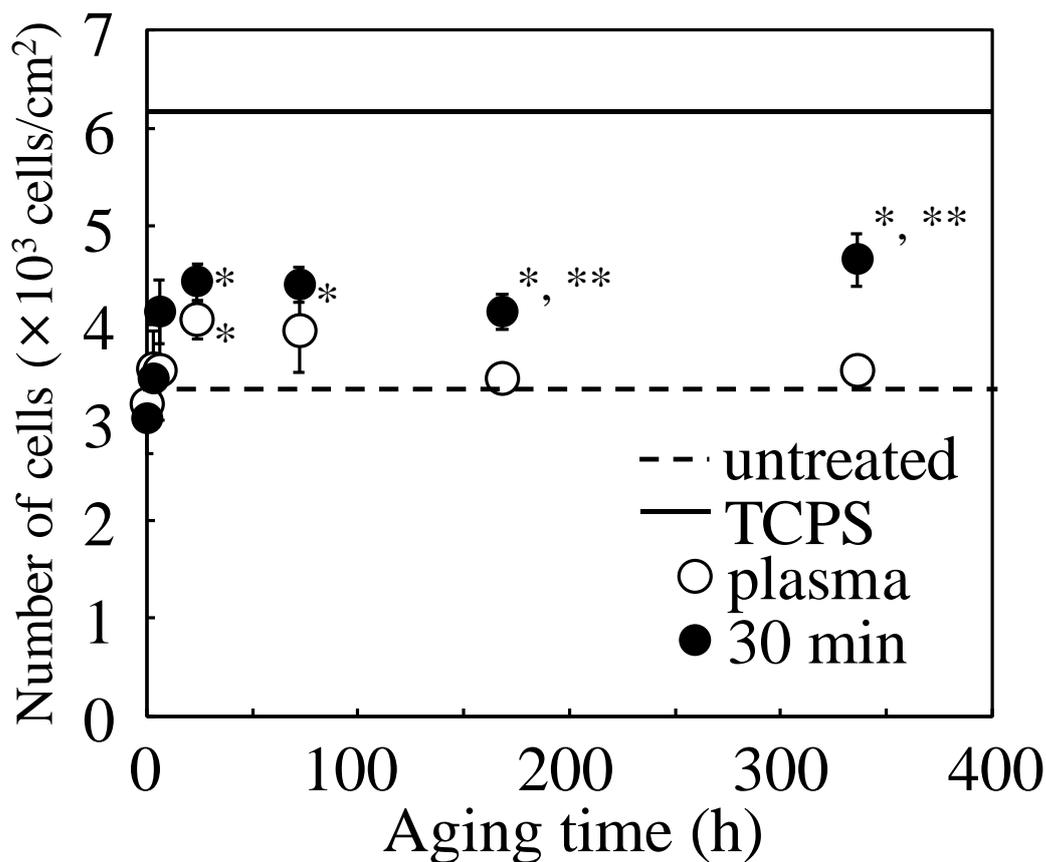


Fig. 5-12 活性酸素および紫外線 30 分間曝露と酸素プラズマ照射後の経過時間による接着細胞数の比較 (mean±SD; n = 3. *: P<0.05 vs. untreated, **: P<0.05).

5.4. 考察

Fig. 5-1 に示した活性酸素および紫外線に曝露した PDMS の C1s XPS スペクトルより、表面改質後のスペクトル強度は減少し、20 min と 30 min において 285 eV~288 eV の領域の強度がわずかに増加した。PDMS はシロキサン結合を主鎖とし、側鎖にメチル基を有する構造をしていることから、XPS によって解析した PDMS に含まれる炭素はメチル基の C-H 結合に由来する。この結果から、活性酸素および紫外線曝露はケイ素と炭素の結合に対して優先的に反応することによって、メチル基の脱離または分解を引き起こしたと考えられる。さらに Fig. 5-2 に示した O1s XPS スペクトルより、untreated で観測されたスペクトルは、シロキサン結合に由来する。untreated と比較して活性酸素および紫外線曝露後に酸素割合が増加し、O1s スペクトルのピークトップが高エネルギー側へシフトした。このシフトは、メチル基が分解、脱離したケイ素に対して炭素より電気陰性度の高い雰囲気中の酸素が結合したことに起因すると考えられる。Fig. 5-3 に示した Si2p XPS スペクトルより、活性酸素および紫外線曝露後は高エネルギー側にピークがシフトしたことから、シリコンに対して酸素が結合していることが推測され、活性酸素および紫外線曝露によってシリコン酸化物を形成していると考えられる。

Fig. 5-4 に示した表面粗さ測定の結果および Fig. 5-5 に示した接触角測定結果より、活性酸素および紫外線曝露前後で表面の粗さに変化がなかったことから、ぬれ性の変化は表面形状に起因するものではなく、メチル基の分解、脱離や酸素の結合など親水性官能基の形成に関わる化学状態の変化によるものと考えられる。活性酸素および紫外線曝露時間を延ばすとぬれ性が向上したことから、曝露時間の増加にともなってメチル基の多くが酸素に置換されたことでぬれ性が向上したと考えられる。表 1 に示した元素組成比および、図 5 に示した接触角測定結果より、plasma は 30 min と比較して少ない酸素割合にもかかわらず接触角が低下したことから、酸素プラズマ照射によって形成された表面改質層は、表面と水の界面における親水性官能基の密度が高いと考えられる。一方、活性酸素および紫外線曝露によって形成された表面改質層は比較的厚いシリコン酸化物層を形成していると推測される。

Fig. 5-6~Fig. 5-9 に示した 30 min と plasma の表面改質前後の O1s, Si2p XPS スペクトルの経時変化の測定結果より、30 min のスペクトルと比較して plasma のスペクトルは、表面改質後の経過時間に伴ってスペクトル形状の変化が顕著であった。この結果から、酸素プラズマ照射によって PDMS 上に形成された表面改質層は活性酸素および紫外線曝露によって形成された表面改質層と比べて不安定であることが考えられる。

Fig. 5-10 に示した表面改質直後の接触角が同等の 30 min と plasma の接触角の経時変化の比較より、プラズマ照射と比較して活性酸素および紫外線曝露で接触角の増加が抑制された。Bodas らの報告によると、プラズマ照射によるこのような疎水性の回復は、低分子化した表面の極性基が材料内部に移動することによって発生すると報告している。Berdichevsky らは、UV/オゾン処理と従来のプラズマ照射の改質効果の安定性を比

較した結果、プラズマ照射と比較して UV/オゾン処理は、接触角の経時変化が抑制され、UV/オゾン処理がプラズマ照射よりも PDMS 表面をより深くまで改質したことによって表面に形成された親水性の分子が材料内部に潜り込むことを抑制したと報告している (Berdichevsky et al., 2004). O1s XPS スペクトルにおけるピークトップより低エネルギー側の強度の増加は、表面に形成されたシリコンと酸素の結合に由来する親水性官能基が材料内部へ潜り込むことに起因すると考えられる. Si2p XPS スペクトルにおけるピークトップより低エネルギー側の強度の増加は、親水性官能基が潜り込んだことによって材料内部の元の PDMS の結合が表面に露出したことに起因すると考えられる. 以上の結果から、O1s, Si2p XPS スペクトルの経時変化が少なかった 30 min は経時変化が顕著に表れた plasma と比較して接触角の経時変化が少なかったと考えられる. その要因として、活性酸素および紫外線曝露は酸素プラズマ照射と比較して厚いシリコン酸化物層が形成されたことによって、表面の親水性官能基の潜り込みが発生しにくい表面改質層を形成したと考えられる. プラズマ照射は電子やイオンの衝突によって高分子材料表面の結合を切断することから、官能基の導入と同時にエッチングも引き起こされる. 一方活性酸素および紫外線曝露はプラズマ照射と比較すると低エネルギープロセスであることから、エッチングを抑えながら比較的深くまで改質されたと推測される. したがって、PDMS に対して長時間の改質効果を維持できる表面改質手法として活性酸素および紫外線曝露は有効であると考えられる.

Fig. 5-11 に示した位相差顕微鏡観察の結果より、untreated と比較して表面改質後の全条件で細胞接着性が向上した. また Fig. 5-12 に示した 30 min と plasma の表面改質後の接着細胞数の経時変化の測定結果より、30 min は表面改質後 24 時間から 336 時間にわたって細胞接着性を維持した. Plasma は表面改質後 168 時間以降で接着細胞数が untreated と同等まで減少した. また、両手法とも表面改質後 6 時間以内で未処理と有意差が見られなかった. plasma は表面改質後 168 時間で約 59°まで接触角が増加し、336 時間後には約 83°まで接触角が増加した. 一方、30 min は 336 時間後で約 54°までの接触角の増加にとどまった. また表面改質後 6 時間の plasma の接触角は約 37°, 30 min の接触角は約 35°であった. Arima らはさまざまな官能基を表面に形成できるアルカンチオール自己組織化膜を用いて、基板表面官能基を制御してぬれ性を制御した表面上で HUVEC および HeLa を培養した結果、約 40°~60°程度の接触角で多くの細胞に関して細胞接着性が向上すると報告している (Arima and Iwata, 2007). 本論文で用いた MC3T3-E1 も同様に細胞接着に適切な接触角の範囲が存在すると考えられる. 活性酸素および紫外線曝露と酸素プラズマ照射それぞれによって PDMS 上に形成される官能基の種類や密度についてより詳細に精査する必要がある.

5.5. 第5章のまとめ

ポリジメチルシロキサンに対する活性酸素および紫外線曝露による表面改質効果の曝露時間依存性および処理効果の安定性を評価した。その結果、曝露後の表面にシリコン酸化物層が形成され、ぬれ性が向上した。さらに、従来の表面改質手法として一般的なプラズマ照射と比較してぬれ性の経時変化の少ない表面が形成された。以上より、活性酸素および紫外線曝露は、細胞接着表面としてPDMS表面を改質することができ、その改質効果は長期間安定的に維持できることを明らかにした。

第5章 参考文献

- (5-1) A. S. Zeiger, B. Hinton and K. J. VanVilet, Why the dish makes a difference: Quantitative comparison of polystyrene culture surfaces, *Acta Biomaterialia*, Vol. 9 (2013), pp. 7354-7361.
- (5-2) P. Singha, J. Locklin and H. Handa, A review of the recent advances in antimicrobial coatings for urinary catheters, *Acta Biomaterialia*, Vol. 50 (2017), pp. 20-40.
- (5-3) C. H. Lin, Y. H. Yeh, W. C. Lin and M. C. Yang, Novel silicone hydrogel based on PDMS and PEGMA for contact lens application, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 123 (2014), pp. 986-994.
- (5-4) S. J. Lugowski, D. C. Smith, H. Bonek, J. Lugowski, W. Peters and J. Semple, Analysis of silicon in human tissues with special reference to silicone breast implants, *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, Vol. 14 (2000), pp. 31-42.
- (5-5) H. Kimura, T. Ikeda, H. Nakayama, Y. Sakai and T. Fujii, An On-Chip Small Intestine–Liver Model for Pharmacokinetic Studies, *Journal of Laboratory Automation*, Vol. 23, No. 3 (2015), pp. 265-273.
- (5-6) A. Kecskemeti and A. Gaspar, Preparation and characterization of a packed bead immobilized trypsin reactor integrated into a PDMS microfluidic chip for rapid protein digestion, *Talanta*, Vol. 166 (2017), pp. 275-283.
- (5-7) Y. Fu, H. Zhou, C. Jia, F. Jing, Q. Jin, J. Zhao and G. Li, A microfluidic chip based on surfactant-doped polydimethylsiloxane (PDMS) in a sandwich configuration for low-cost and robust digital PCR, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 245 (2017), pp. 414-422.
- (5-8) P. J. Wipff, H. Majd, C. Acharya, L. Buscemi, J. J. Meister and B. Hinz, The covalent attachment of adhesion molecules to silicone membranes for cell stretching applications, *Biomaterials*, Vol. 30 (2009), pp. 1781-1789.
- (5-9) J.A. Juárez-Moreno, A. Ávila-Ortega, A.I. Oliva, F. Avilés and J.V. Cauich-Rodríguez, Effect of wettability and surface roughness on the adhesion properties of collagen on PDMS films treated by capacitively coupled oxygen plasma, *Applied Surface Science*, Vol. 349 (2015), pp. 763-773.
- (5-10) D. Bodas, J. -Y. Rauch and C. Khan-Malek, Surface modification and aging studies of addition-curing silicone rubbers by oxygen plasma, *European Polymer Journal*, Vol. 44 (2008), pp. 2130–2139.
- (5-11) D. Lee and S. Yang, Surface modification of PDMS by atmospheric-pressure plasma-enhanced chemical vapor deposition and analysis of long-lasting surface hydrophilicity, *Sensors and Actuators B: Chemical*, Vol. 162 (2012), pp. 425–434.
- (5-12) L. H. Zhao, J. Lee and P. N. Sen, Long-term retention of hydrophilic behavior of plasma treated polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces stored under water and Luria-Bertani broth,

- Sensors and Actuators A: Physical, Vol. 181 (2012), pp. 33–42.
- (5-13) D. T. Eddington, J. P. Puccinelli and D. J. Beebe, Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane, Sensors and Actuators B: Chemical, Vol. 114 (2006), pp. 170-172.
- (5-14) D. Bodas and C. Khan-Malek, Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation, Sensors and Actuators B, Vol. 123 (2007), pp. 368-373.
- (5-15) Y. Berdichevsky, J. Khandurina, A. Guttman and Y.-H. Lo, UV/ozone modification of poly(dimethylsiloxane) microfluidic channels, Sensors and Actuators B, Vol. 97 (2004), pp. 402-408.
- (5-16) Y. Arima and H. Iwata, Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers, Biomaterials, Vol. 28 (2007), pp. 3074-3082.

第 6 章

総 括

本研究「紫外線励起活性酸素による高分子材料の表面改質に関する研究」では、低温かつドライな大気圧環境で生成可能であり、高い反応性を有する紫外線励起活性酸素を用いた高分子材料の新規表面改質技術の確立を目指した。

第1章は緒論であり、研究背景として現行の表面改質技術についてまとめ、それぞれの特徴と、問題点を提起した。活性酸素の特徴と生成メカニズムについて述べ、表面改質として応用することによって得られるメリットをまとめた。その上で本研究の目的を定義した。

第2章では、活性酸素濃度を高めることによって表面改質効果を高めるために、減圧プロセスを経ることを想定し、低真空環境下で活性酸素を検知可能な ESR スピントラップ法による活性酸素検知技術の開発を行った。一般的にスピントラップ剤は液体溶媒に溶解するため、真空中の活性酸素検知への応用が困難であった。そこで、スピントラップ剤をヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) と混合して膜化することによって活性酸素検知膜を作製し、活性酸素検知性能を評価した。その結果、低真空環境下でも活性酸素の検知が可能であり、過去に報告されたポリビニルアルコールを用いた活性酸素検知膜と比較して、活性酸素検知強度が約 3.3 倍向上した。また、活性酸素は HPMC 内へ約 100 μm にわたって拡散し、その拡散挙動はフィックの法則にしたがうことを確認した。

第3章では基本骨格であるポリエチレン (PE) と側鎖の構造が異なるポリプロピレン (PP)、ポリスチレン (PS) を活性酸素に曝露し、活性酸素による汎用性高分子材料の表面改質効果を比較することにより、活性酸素による高分子材料の表面改質メカニズムについて考察した。その結果、活性酸素による表面改質は表面形状に物理的な変化を伴わないことが明らかになった。また、元素組成や官能基形成といった表面の化学的特性や、ぬれ性に変化をおよぼすことが明らかになった。これらの作用は側鎖の分子構造によって異なり、反応性の高い第三級水素や、ベンゼン環を有する PS は表面改質効果が顕著に表れた。以上より、活性酸素による表面改質は酸化反応を主体とし、表面の粗面化など物理的な変化を伴わない化学的な表面改質手法であることが明らかになった。

第4章では第3章で得られた知見をもとに、最も表面改質効果が顕著に表れた PS を供試材料として、活性酸素曝露条件によって PS 表面に与える変化や、活性酸素によって PS 表面に形成される表面改質層を詳細に評価した。また、ディスプレイ細胞培養基板材料として広く用いられる PS を活性酸素に曝露し、細胞接着性向上を目的と

した表面改質へ活性酸素を応用した。活性酸素生成源である紫外線ランプとの距離を変更して表面改質効果を評価した結果、紫外線ランプに近い条件で表面改質効果が高かった。第2章で報告した活性酸素検知膜により、紫外線ランプとの距離による活性酸素生成濃度を比較した結果、表面改質効果の違いは活性酸素濃度によるものであることを明らかにした。また、曝露時間を変更することによってPSの表面特性に与える変化を評価した結果、活性酸素に曝露したPS表面のぬれ性と元素組成には相関関係があることを明らかにした。同等の元素組成を有する活性酸素に曝露したPS表面と酸素プラズマ照射が施されたPS表面を、角度分解X線光電子分光によって比較した結果、活性酸素に曝露したPS表面は比較的深くまで均一に酸素が導入され、表面に露出する極性基の密度は比較的小さいことが明らかになった。また、活性酸素によって表面特性を制御したPS表面の細胞接着性を比較した結果、PS表面のぬれ性は細胞接着性に直接的な影響を及ぼさず、表面の元素組成が支配的に細胞接着性に影響を与えると示唆された。

第5章では第3章、第4章で取り上げたようなプラスチックとは異なる、柔軟なシリコーンゴムの一種であるPDMS供試材料として、活性酸素および活性酸素生成時に使用する紫外線を併用した表面改質効果を評価した。PDMSは分子構造の柔軟性から酸素プラズマ照射ではすぐに表面改質効果が失われることが報告されていることから、経時的な表面改質効果の変化を評価し、PDMSの表面改質技術として紫外線および活性酸素の有用性を検討した。その結果、PDMSの主鎖のシロキサンと側鎖のメチル基のSi-C結合に作用し、シリコン酸化物層が形成され、疎水性のメチル基の脱離や親水性官能基の形成によってぬれ性が向上することを明らかにした。さらに、表面改質手法として一般的なプラズマ照射と比較してぬれ性の経時変化の少ない表面が形成された。これは、プラズマ照射と比較すると低エネルギープロセスであることから、エッチングを抑えながら比較的深くまで改質されたと推測される。以上より、活性酸素および紫外線曝露は、細胞接着表面としてPDMS表面を改質することができ、その改質効果は長期間安定的に維持できることを明らかにした。

以上、本論文は、紫外線励起活性酸素による表面改質は表面の粗面化など物理的な変化を伴わず、ラジカル反応や水素引き抜き反応といった化学反応が主体であることを明らかにした。活性酸素検知技術を開発した上で活性酸素濃度と表面改質効果を比較した結果、表面改質効果は活性酸素濃度が高いほうが促進されることを明らかにした。また、活性酸素によって形成された表面のぬれ性と元素組成には相関関係が見られ、プラ

ズマ照射と比較して深くまで酸素が導入されていることから深さ方向に均一な表面改質層を形成することを明らかにし、活性酸素による表面改質の特徴を明らかにした。さらに、材料への細胞接着について、接触角よりも表面元素組成が支配的に作用することを見出し、工業的、学術的に意義のあるものとする。

謝辞

本研究の遂行および本論文作成に当たり、指導教員である東海大学工学部機械工学科 岩森暁教授から多大なるご指導、ご助言を賜りました。岩森先生は非常に多忙な中、学生にはその素振りを見せず、常に笑顔で研究を支えていただきました。また、学部3年次から5年間という通常より短い期間ではありましたが、岩森先生の研究室の一員として、非常に多くの経験をさせていただきました。ここに深く感謝し、御礼申し上げます。

成蹊大学理工学部物質生命理工学科 大家溪助教には、本研究の遂行にあたり、細かな相談に乗っていただき、数多くのアドバイスをいただきました。論文作成や学会発表へのご助言、ご指導だけでなく、非常に優柔不断な私を精神的にも支えていただきました。心より感謝いたします。

本論文の作成に当たり、東海大学工学部機械工学科 木村啓志 准教授、落合成行 教授、神崎昌郎 教授、砂見雄太 講師、同精密工学科 槌谷和義 教授には貴重なご意見を賜りました。先生方には、学部生のころから授業や学科の催し物など様々な場面で気にかけていただき、付属高校出身の私の学生生活を高校生3年生のころから支えていただきました。深く感謝いたします。

岩森研究室の先輩、同期、後輩の皆さんには、実験の手助けだけでなく、気分転換にも付きあってもらいました。特に、東海大学工学研究科機械工学専攻 修士課程2年生の高橋一成君、須藤巧君、北條健太君には、同じ研究グループのメンバーとして、学部3年生のころから約3年にわたって多くの実験を共にし、サポートをしていただきました。彼らの存在がなければこの論文は完成しませんでした。本当にありがとうございました。

各解析装置の使用方法や解析データの扱い方の指導を頂きました、技術共同管理室 元室長 宮本泰男様ならびに、森川 真希様、小田慶喜様、原木 岳史様に感謝いたします。やさしく丁寧に、時に長時間議論に付き合ってください、装置の仕組みから考えることで得られる情報量が全く違うことが実感できました。

最後に、温かく見守り、ささえてくれた両親に深く感謝いたします。