

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K03811

研究課題名（和文）低温大気圧プラズマを用いた骨再生促進技術の開発と整形外科領域への展開

研究課題名（英文）Clinical application of non thermal atmospheric pressure plasma in bone regeneration

研究代表者

洲鎌 亮（Sugama, Ryou）

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：00779457

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではウサギ尺骨欠損モデルを用い、骨欠損部へ低温大気圧プラズマ照射をした群としない群で新生骨の再生に違いがどうかを比較しました。その結果、プラズマ照射時間を5分、10分、15分と変えたプラズマ照射群では、どれも新生骨の再生が確認されました。また、10分照射した群で、コントロールのプラズマを含まないガスを照射した群に比べて8週間後に最も新生骨量が多くなる結果が得られました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で示された低温大気圧プラズマ照射による骨再生促進作用は、整形外科や歯科口腔領域、脳神経外科などの医療分野において骨折治癒期間の短縮、骨欠損部の確実かつ効率的な修復の実現に利用可能な技術になります。低温大気圧プラズマ照射は、既存の生体組織の構造を維持したまま方面改質をもたらす可能性があり、開発した照射装置は手術中に使用できる装置として骨形成能を促進する医療機器になり得るのではないかと考えます。

研究成果の概要（英文）：The research group developed a pencil-type plasma device that can effectively generate and deliver RONS to an animal model with a well-established critical bone defect, allowing the team to search for the optimal irradiation conditions. Comparing groups that were irradiated with NTAPP for 5, 10, and 15 minutes to control groups with no plasma administered, micro-CT images at eight weeks showed the 10-minute treatment time as the most successful bone regeneration with 1.51 times larger bone volume than the control group.

研究分野：整形外科

キーワード：低温大気圧プラズマ 骨欠損 骨新生 ウサギ

1. 研究開始当初の背景

骨折は、小児期から高齢期、全ての年齢層における健康上の大きな問題の1つである。平成25年厚生労働省のデータによると、65歳以上の要介護の原因のうち、転倒/骨折が12.2%を占め、脳血管疾患、高齢による衰弱に次いで高いリスクとなっている。また、国内のデータは存在しないが、スウェーデンの大規模調査では0歳から16歳までに男性で42%、女性で27%が骨折を経験していると報告されている。骨再生を促進させる次世代型骨再生医療技術の開発は、高齢者の寝たきりの防止や若い世代の一日も早い社会復帰に多いに貢献するものと考えられる。

骨再生医療における新しい治療戦略の創出にあたり、申請者が注目したのは低温大気圧プラズマ技術の活用である。プラズマとは活性粒子(電子、イオン、分子、ラジカル、光)の集合体であり、気体に高音加熱や電氣的衝撃などの高エネルギーを加えることで分子の解離や原子の電離を生じさせてプラズマを発生させている。プラズマを発生させるためには減圧もしくは超高温環境が必要であったが、近年の理論/技術の革新により大気圧、低温化環境下、さらには溶液中での発生が可能となり、幅広い分野での応用されるようになった。医療分野においては、医療材料の表面改質・表面処理や滅菌技術などに用いられてきたが、近年注目されている分野は生体組織への直接照射である。生体組織に直接プラズマを照射することにより、がん細胞のアポトーシス誘導)や皮膚疾患の治癒・再生が促進されたとの報告が出されるようになり革新的医療技術としての期待が高まってきている。プラズマが生成する活性酸素種・窒素種に起因すると考えられているが、生きた細胞に一定以上照射すると細胞が不活化し、照射量が少ないときには細胞に逆に刺激を与え、その増殖が促進される可能性が示されつつある。

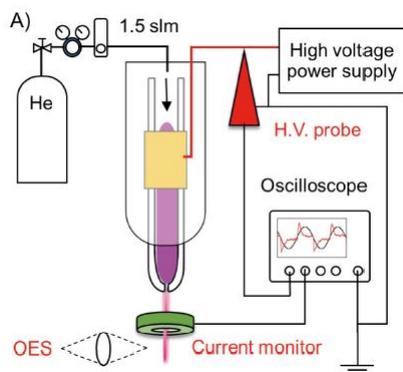
2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が所属する大学の工学部(電子物理)と医工連携を行い、生体への熱的、電磁的ダメージが極めて低い低温大気圧プラズマジェット技術を活用した次世代骨癒合促進技術の創出である。骨折部や骨欠損部に直接照射することによって、骨癒合期間を短縮させることが可能なのか、短縮されるとすれば最適なプロトコルや照射設定はどのようなようになるのか、骨補填材料を用いた骨再生にどのような変化をもたらすのか等に関する基礎実験を行い、本領域における技術革新を行う予定である。

3. 研究の方法

1) 低温大気圧プラズマ装置

本研究グループは骨欠損部位に照射可能なペンシルタイプの低温大気圧プラズマ装置を開発し、骨欠損部への安定的なプラズマ照射、至適照射条件の探索を可能にした。



2) 対象と手術

ニュージーランドホワイトラビット尺骨欠損モデルを用いて、プラズマ照射による骨再生能の影響について検証した。尺骨に約1cmの骨欠損を作製し、骨欠損部にプラズマを含まないガスを照射した群(コントロール群)とプラズマ照射時間を5分、10分、15分と変えたプラズマ照射群をそれぞれn=5で作製した。



3) X線、CT画像解析

X線は2週間毎に術後8週間まで撮影した。術後8週間のX線画像を用いて、それぞれの骨欠損部領域に占める新生骨領域の割合を画像解析ソフトのimage Jを用いて測定した。術後8週間で犠牲死させたウサギの尺骨を切除し、 μ CTを撮像した。再構築した画像から3次元解析ソフト(ExFact VR, Nihon Visual Science, Inc. Japan)を用いてそれぞれの新生骨体積を測定した。

4) 組織学的分析

骨欠損部の断面をヘマトキシリン・エオジン染色、マッソントリクローム染色を行い、組織評価した。

5) XPS, surface wettability, thermal imaging

低温大気圧プラズマ照射による骨表面の化学的変化および親水性の変化をX線光電子分光法(XPS (ESCA-3400, Shimadzu, Japan))およびwater contact angle (WCA)をcontact angle analyzer (DMe-211, Kyowa Interface Sci. Co., Japan)を用いて測定することで評価した。XPSの分析には7mm×7mmのウサギ脛骨の皮質骨片を使用。プラズマを照射した皮質骨片とプラズマを含まないガスを照射した皮質骨片を比較した。WCAは同様に作製した脛骨皮質骨片の表面に1 μ Lの蒸留水を滴下し水滴と皮質骨表面との接触角を測定比較した。また、プラズマ照射による皮質骨表面の温度の変化をサーモグラフィカメラ(T560, FLIR T560, FLIR®, USA)、解析ソフト(T56FLIR Tool, FLIR®, USA)を用いて調査した。各検査のプラズマ照射時間は新生骨量が最も多かった10分に統一した。

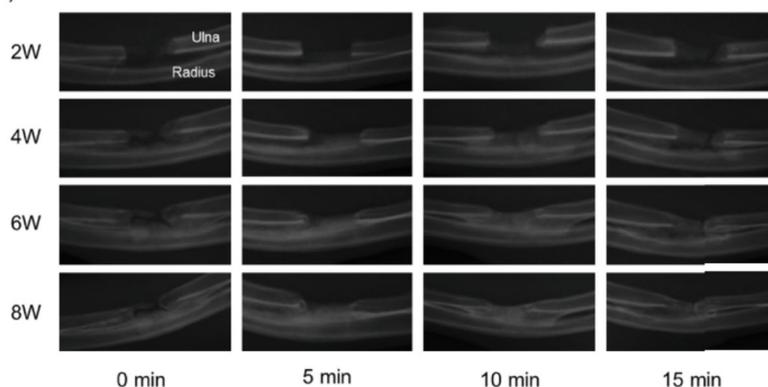
4. 研究成果

1) X線画像

全例で、橈骨から経時的に新生骨が欠損部を埋めていく像がみられた。

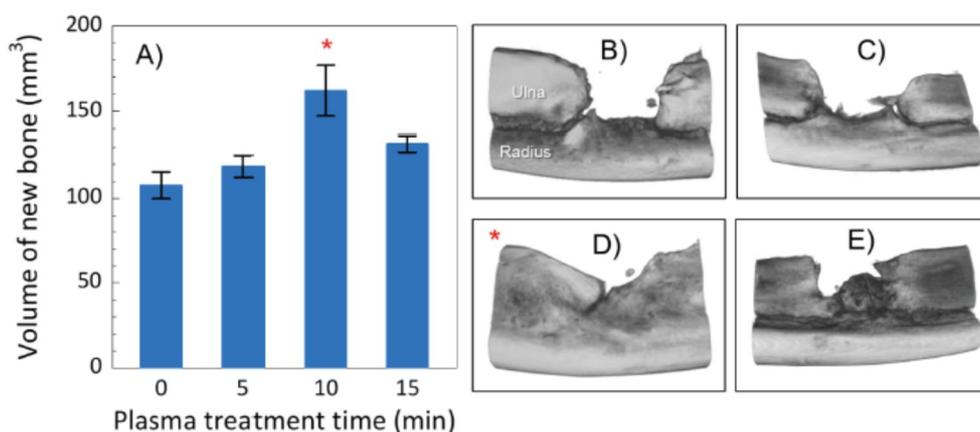
術後8週間での骨欠損部位の新生骨の平均占有率は10分照射群が83%と最も高く、15分照射群が70%、5分照射群が67%であった。一方コントロール群は59%と最も低かった。

A)



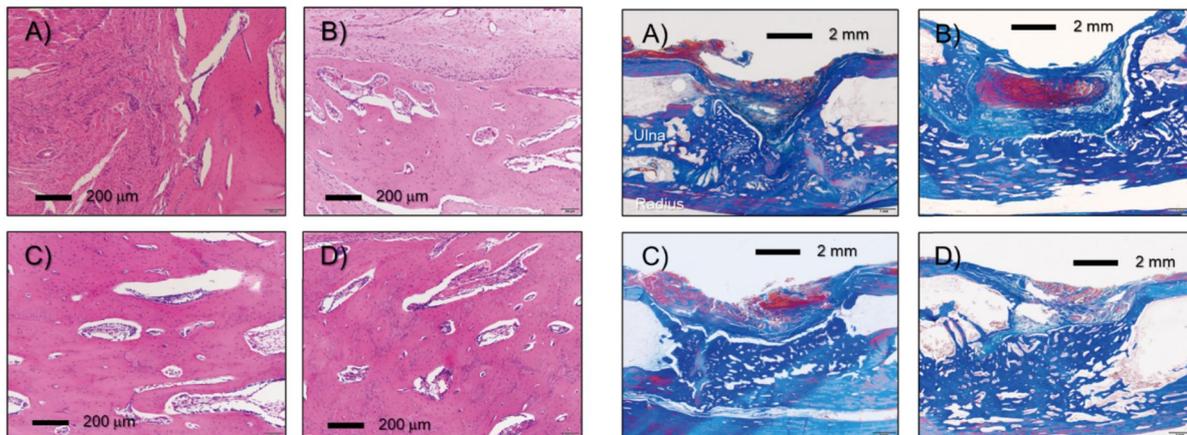
2) CT画像

新生骨体積の平均は10分照射群が162.2 (\pm 14.8) mm³, 15分照射群が131.7 (\pm 4.8) mm³, 5分照射群が118.6 (\pm 6.4) mm³, コントロール群が107.6 (\pm 7.8) mm³であった。最も新生骨体積が大きかった10分照射群とコントロール群の間に統計学的有意差があった(P=0.0036)。



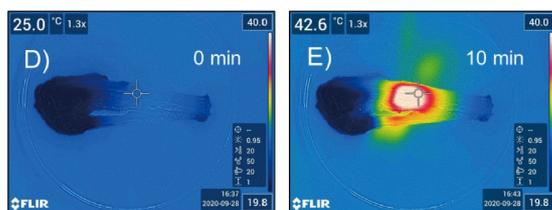
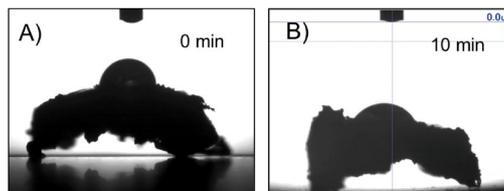
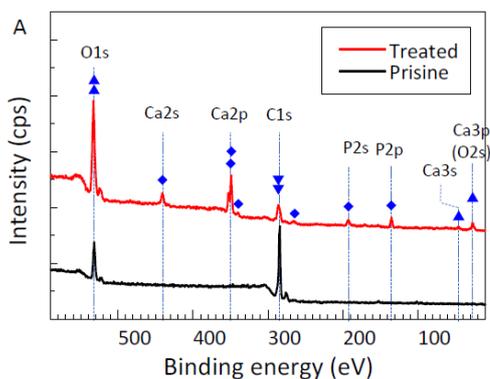
3) 組織学的分析

コントロール群ではわずかに新生骨が観察されたが、線維組織や介在物のために、骨欠損間のギャップが新しい骨で満たされる例はなかった。一方、プラズマ照射群では、H&E 染色画像で有核細胞が均一に観察され、マッソントリクローム染色画像で骨欠損部に介在物なく新生骨が連続していることが確認された。



4) XPS, surface wettability, thermal imaging

XPS の結果、プラズマ照射により皮質骨表面に酸素元素の著明な増加が確認された。このことにより親水性が増加し、細胞接着能が改善した可能性がある。コントロールの脛骨表面の 90.5 ± 7.9 の WCA と比較して、プラズマ処理された脛骨表面の WCA は 42.0 ± 8.8 と低く親水性の増加が示唆された。また、プラズマ処理による熱効果については、10 分間の照射で表面温度が最高で 43°C まで上昇したが、 45 度までは骨形成細胞に影響を与えないと報告されており、安全であることがわかった。



5) まとめ

プラズマを含まないガスを照射した群（コントロール群）とプラズマ照射時間を 5 分、10 分、15 分と変えたプラズマ照射群とで新生骨量を比較したところ、10 分照射した群で最も新生骨量が多い結果が得られた。プラズマ照射を行うことで組織の親水化が促進されたことが要因の一つと考えられる。低温大気圧プラズマを生体、即ち骨欠損部位に直接照射することで骨形成が促進されることを発見した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimatani Akiyoshi, Toyoda Hiromitsu, Orita Kumi, Hirakawa Yoshihiro, Aoki Kodai, Oh Jun-Seok, Shirafuji Tatsuru, Nakamura Hiroaki	4. 巻 16
2. 論文標題 In vivo study on the healing of bone defect treated with non-thermal atmospheric pressure gas discharge plasma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0255861
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0255861	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 特許権	発明者 豊田宏光	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-139761号	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	豊田 宏光 (Hiromitsu Toyoda) (50514238)	大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授 (24402)	
研究分担者	折田 久美 (Orita Kumi) (40748597)	大阪市立大学・大学院医学研究科・博士研究員 (24402)	
研究分担者	白藤 立 (Tatsuru Shirafuji) (10235757)	大阪市立大学・大学院工学研究科・教授 (24402)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	呉 準席 (Jyunsoku Oh) (90533779)	大阪市立大学・大学院工学研究科・教授 (24402)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関