

機関番号：15201
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591755
 研究課題名（和文）大気圧低温プラズマを用いた腱癒着防止・腱縫合部癒合促進技術の開発
 研究課題名（英文）Technological development of the atmospheric low-temperature plasma to treat the tendon healing and adhesion
 研究代表者
 内尾 祐司（UCHIO YUJI）
 島根大学・医学部・教授
 研究者番号：20223547

研究成果の概要（和文）：大気圧低温プラズマによって手術後癒着防止を試みた。照射表面の化学組成が変化し、繊維芽細胞の活性が低下することを確認した。腱の癒着が抑制される傾向が見られたが、この効果は手術後早期の安静度にも大きく影響を受けていた。

研究成果の概要（英文）：The effect of atmospheric low-temperature plasma on post-operative adhesion was observed. The chemical composition on the surface of the treated collagen tissue was changed. The biological activities of fibroblasts, which were cultured on the treated tissue, were inhibited. The in vivo adhesion of the tendon was tended to inhibited, although it was influenced by the post-operative activities.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科

キーワード：腱、外傷、癒着、大気圧プラズマ、予防、繊維芽細胞、酸素、窒素

1. 研究開始当初の背景

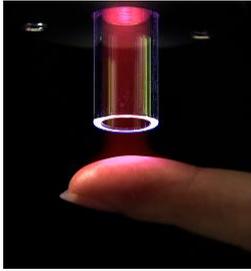
腱損傷は癒着や手指の拘縮を生じやすい。これに対してヒアルロン酸による癒着防止作用が試みられたが、その有効性は不十分とされている。従って、腱縫合後に癒着防止効果を実に与える薬剤や医療機器の開発が望まれる。

一方、プラズマは強い電磁波によって電離した気体をいい、照射すると表面の微細形状を

変化させたり表面に活性基を形成したりする。

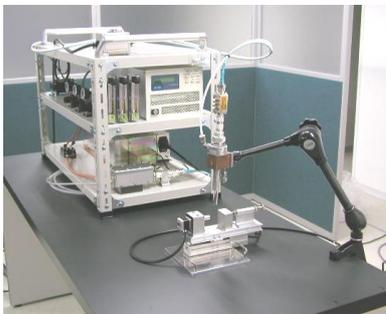


なかでも、大気圧低温プラズマは、解放空間で40～50℃程度であるため、技術的には人体に照射できる。



手指に照射可能

これまで生体組織をプラズマ処理した報告はないが、プラズマは、物質内部に浸透しないため副作用の心配がなく、滅菌技術に利用されるほど清潔で、コンパクト化軽量化ができること等、手術機器としての利点を有している。



プラズマ発生装置

そこで、このプラズマを腱縫合後の腱癒着防止に応用することを考えた。すなわち、腱縫合部表面にプラズマ処理を施すことで腱表面の生物反応を変化させ、癒着を防止させようとするものである。

2. 研究の目的

プラズマ技術を手術治療に応用する上で必要となる基礎データを収集する。

(1) プラズマによる表面化学性状の変化を検出する。

(2) 細胞にとって付着を難しくするプラズマ照射条件を検索する。

(3) In vivo で癒着を防止させるプラズマの条件を検索する。

(4) 薬剤の効果を促進させるようなプラズマの効果を検索する。

3. 研究の方法

(1) プラズマによる表面化学構造変化

①材料：家兎後脛骨筋腱およびシリコン

②プラズマ照射。アルゴン (1-2slm, 100W) と酸素 5-10%。

③X線光電子分光 XPS。

(2) プラズマ処理腱の上で細胞培養

①兎後脛骨筋腱および骨板をプラズマ処理

②線維芽細胞系培養細胞 (正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF) および兎後脛骨筋腱の初代培養細胞を上記材料の上で培養

(10000cell/4cm²)

③細胞形態、遊走能、分裂能を観察

(3) in vivo 腱癒着防止

①静脈麻酔下に家兎の足根管を展開して後脛骨筋腱を露出し、同部をナイフで表面に傷をつけた。同様にラットの4頭筋腱の後面を露出し、同部の滑膜を切除した。

②腱露出部をプラズマ照射

③1週間ゲージ内で飼育、活動度観察

④インストロン力学的万能試験機を用いて腱の引き抜き強度を測定

⑤近傍組織の病理増から細胞障害性を検討

(4) プラズマの細胞への直接照射

①線維芽細胞系培養細胞 (正常ヒト皮膚線維芽細胞 NHDF) および兎後脛骨筋腱の初代培養細胞を通常プレート上で培養

②培養液を除いて、細胞が露出した状態で、弱いプラズマ (1slm, 100W) を照射

③dead/alive stain, β ガラクトシダーゼ遺伝子の導入による生体染色

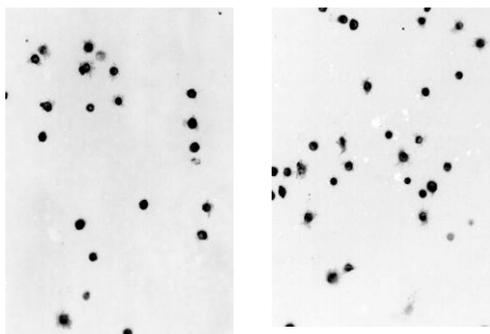
4. 研究成果

(1) 表面化学性状の変化

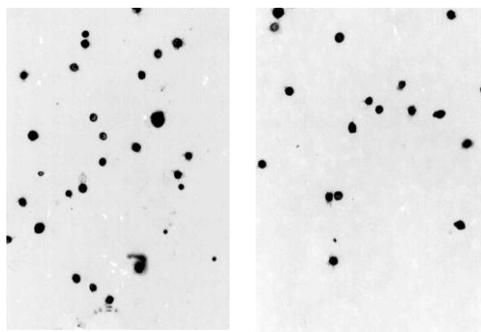
無処理組織と比較してヘリウム単独プラズマ照射組織は、C-O結合、C-N結合に由来するピークが減少していた。また、C=O結合由来と推測されるピークとO-C=O結合由来と推

測されるピークは僅かながら減少していた。一方、酸素 5%混和ヘリウムでは O-C=O 結合の存在比率が増加していた。以上から、プラズマ照射によって、生体組織の表面の官能基組成に変化が生じていることが確認できた。

(2) プラズマ処理腱の上で細胞培養



兔腱細胞をプラズマ処理腱（上図左）と非処理腱（上図右）で培養した。統計学的有意差はなかったもののプラズマ処理腱に附着する細胞は少ない傾向にあった。細胞の大きさや遊走能には明らかな傾向は無かった。



兔腱細胞をプラズマ処理腱（上図左）と非処理腱（上図右）で培養した。統計学的有意差はなかったもののプラズマ処理腱に附着する細胞は少ない傾向にあった。細胞の大きさや遊走能には明らかな傾向は無かった。

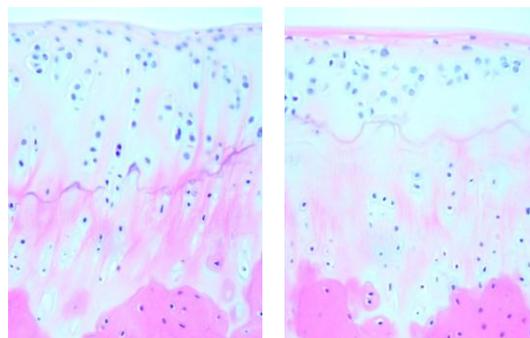
(3) in vivo 腱癒着防止

兔の後肢を利用して手術を行ったが、結果のバラツキが大きく、実験群を増やして実験す

べきであると判断して、ラットの膝関節（4頭筋腱）を利用した。

	癒着強度 (mN)
	平均±標準偏差
無照射	0.76±0.32
プラズマ照射 (ヘリウム w/o 酸素)	
He 2s1m	0.70±0.31
He 1s1m	0.60±0.23
He 2s1m+O ₂ 5%	0.73±0.30
He 1s1m+O ₂ 5%	0.58±0.32

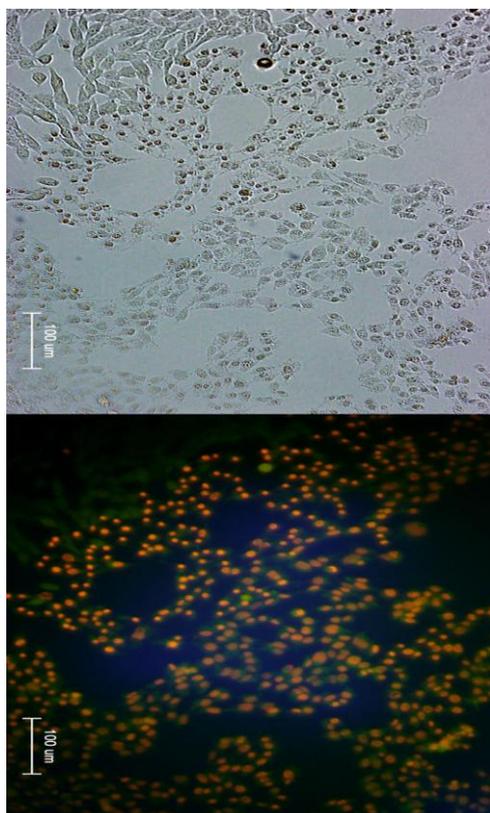
統計学的有意差は無かったものの、ヘリウム 1s1m では酸素混和の有無にかかわらず、癒着強度が小さい傾向が見られた。比較的標準偏差が大きいのは、手術後の活動量が個々の動物によって大きく異なるためと考えられた。定量化は難しいものの、手術後早期から活発に運動していた固体では癒着強度が小さい傾向があった。つまり、活動度が大きい固体においては、プラズマの効果は顕著ではなかった。一方、ヒトの臨床に比べると、明らかに手術後活動度は大きかった。したがって、人の臨床においては、プラズマ処理によって癒着防止ができる可能性が示唆された。



細胞への障害性を調べるために、近傍組織の組織像を観察した。上図左はヘリウム 1 s1m で照射、上図右はヘリウム 2 s1m で照射した場合である。ヘリウム 2 s1m では表層の細胞

核がやや膨化している。ヘリウム流量が増加すると癒着防止効果が見られなかったことは、組織障害性が生じたため、組織反応が増加した可能性がある。

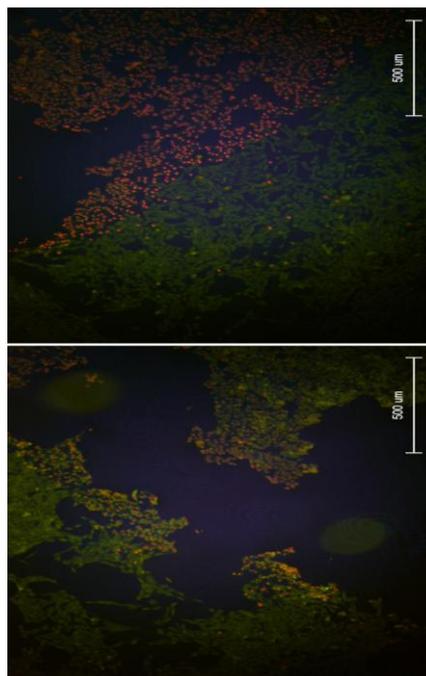
(4) プラズマの細胞への直接照射



上図：位相差顕微鏡像

下図：傾向顕微鏡像

プラズマ照射条件を詳細に設定すると (1 slm/cm^2 , 100w, 1cm, 30sec)、照射野の比較的辺縁では、正常な細胞活動を保ったまま (細胞質は緑色)、細胞膜の透過性は亢進 (核がオレンジ色) した。後者は、通常の細胞では死滅したことを示唆する。つまり、プラズマ照射により、細胞を生きのまま、通常では取り込まれない薬剤を細胞内に届けることができる。この性質を利用すれば、薬剤の効果を高めることができる可能性がある。



プラズマが過剰に照射されると (1 slm/cm^2 , 100w, 1cm, 60sec)、細胞は死滅した (核がオレンジ色)。一方、生きた細胞 (緑色に染色) と死細胞の境界は明瞭であり、プラズマ処理が限局した局所に可能であることを示唆した。

続いて、 β ガラクトシダーゼ遺伝子の導入を試みたが、発現を検出することができなかった。上記のように、プラズマ照射の効果は、ガス種、エネルギー、時間など多数のファクターによって、劇的に異なる。本実験期間には、適切な条件を見出すことができなかった。しかし、適切な条件が見つかり、細胞の変化が制御できるようになれば、細胞核に作用する薬剤の効果を高めることができる。引き続きプラズマ照射の条件を検索する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

1) Imade S, Mori R, Uchio Y, Furuya S.
Effect of implant surface roughness on
bone fixation: the differences between
bone and metal pegs. Journal of
Orthopaedic Science. 2009; 14: 652-657.

[学会発表] (計4件)

- 1) 今出真司、森 隆治、内尾祐司、ナノデバ
イスとプラズマ技術を用いた治療法の開
発. プラズマ生物学シンポジウム、大阪大
学 2010年2月5日
- 2) 今出真司、森 隆治、内尾祐司: 骨癒合
に対するプラズマ表面処理の影響. 第24回
日本整形外科学会基礎学術集会. 横浜,
2009年11月
- 3) Mori R. The 3rd Workshop on Biological
Applications of Plasma/Photon
Processing. 医療における大気圧プラズマ
の可能性. 大阪、2009年1月29日
- 4) 森 隆治、今出真司、浦山卓也、高木康治
: 生体内の癒着を防止する大気圧プラズマ
治療. 第25回プラズマ・核融合学会年会.
宇都宮、2008年12月

[その他]

ホームページ等

[http://www.med.shimane-u.ac.jp/orthop/s
tudy/index.html](http://www.med.shimane-u.ac.jp/orthop/study/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内尾 祐司 (UCHIO YUJI)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 20223547

(2) 研究分担者

森 隆治 (MORI RYUJI)

島根大学・プロジェクト研究推進機構・准教
授

研究者番号: 40263537

中井 毅尚 (NAKAI TAKAHISA)

島根大学・総合理工学部・准教授

研究者番号: 90314616

(3) 研究協力者

今出 真司 (IMADE SHINJI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 10581077