

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890131

研究課題名（和文）大気圧低温プラズマを用いたハイブリッド人工半月板の開発

研究課題名（英文）Development of hybrid artificial meniscus using atmospheric-pressure low-temperature plasma

研究代表者

桑田 卓（KUWATA SUGURU）

島根大学・医学部・助教

研究者番号：80509000

研究成果の概要（和文）：膝関節内のクッションである半月板は再生しない組織である。われわれは、一定の強度をもったインプラント表面に細胞を接着させてハイブリッド半月板を作製することを考案した。細胞接着促進のためにプラズマテクノロジーを応用し、照射が細胞に与える影響を検討した。人工物への照射が細胞接着を促進させること、生体内への直接的な照射が安全であることが明らかになり、ハイブリッド半月板の作製や手術中の関節内組織照射による周辺滑膜細胞の誘導と組織修復を期待できると考えた。

研究成果の概要（英文）： We prepared a hybrid meniscus where cells are adhered on the implant surface with certain strength. Plasma technology was applied to promote adhesion of cells and the influence of irradiation to cells was examined. It was revealed that irradiation to an artificial material promotes adhesion of cells and that direct in-vivo irradiation is a safe method. We considered it would be possible to prepare a hybrid meniscus, and to induce marginal synovial cells by irradiation to the intra-articular tissue during surgery to reproduce such tissue.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	880,000	264,000	1,144,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,780,000	534,000	2,314,000

研究分野：整形外科・膝関節

科研費の分科・細目：

キーワード：半月板損傷・プラズマ

1. 研究開始当初の背景

膝関節半月板の無血行野の損傷は関節軟骨損傷と同様に治療が困難な外傷である。半月板の2/3を占める無血行野での損傷では部分切除術を行うほかなく、いったん切除された半月板は再生しない。荷重伝達やクッションの役割を果たす半月板がなくなればその機能が失われ、関節軟骨に負荷が増し、軟骨損傷や変性、ひいては変形性膝関節症を来す。従って、半月板の機能を温存した修復法や切除後の半月板の再建が必要とされている。

これまで関節軟骨損傷に対する再生医学・医療は1994年以来、Brittbergら、2000年Ochiらによってなされ臨床応用されてきた。しかし、半月板については半月板細胞を培養し、コラーゲンの担体に包埋させて人工半月板を作製する試みは行われていたが、荷重伝達やクッションの機能を得るまでには至らなかった。これは移植時にこれらの機能に耐える強度が得られなかったことが一因と考える。そこでわれわれは一定の強度をもった人工インプラント表面に軟骨細胞や滑膜細胞を接着させて、細胞と人工インプラントとのハイブリッド半月板を作製することを考案した。

細胞接着を促進させる手法として、われわれはプラズマテクノロジーを応用することを考え、手術室でも使用可能な大気圧低温プラズマ発生装置を使用することとした。プラズマと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 (Tamada Y, *et al.*: Polymer 1993, Steele JG *et al.*: J Biomater Sci Polym Edn 1994, Poncin-Epaillard F *et al.*: J Biomater Sci Polym Edn 2003, Gugala Z *et al.*: J Biomed Mater Res A 2006, Lerouge S *et al.*:

Biomaterials 2007)。

すなわち、人工インプラント表面にプラズマ処理を施すことで細胞接着を促し、ハイブリッド人工半月板を作製しようとするものである。この手法はこれまでに報告がなく、最適な照射条件の検索や照射が細胞に与える影響などについて詳細に検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細胞あるいは人工物へのプラズマ照射が細胞接着能におよぼす効果を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) プラズマ発生装置の調整

実験開始からプラズマ放電用アンテナ (アルミ) の劣化に伴うプラズマの不安定性に問題があった。

そこでステンレス、チタン、鉄、ハフニウム、モリブデン、銅タングステン、銀タングステンの各材料について検討した。

酸化1時間、窒化1時間を交互に13時間繰り返した後にその影響を評価した。

(2) 生物学的効果の検討

①シートへの照射

ウシ大腿骨骨幹部皮質骨中間層から作成した骨性シート表面にプラズマを照射した。シート上に細胞 (MC3T3-E1) 浮遊液を垂らし、2分後、5分後、10分後にシートに付着した細胞を顕微鏡で観察した。無処理 (コントロール)、窒素プラズマ照射、酸素プラズマ照射について比較検討した。

②細胞への照射

細胞自体へのプラズマ照射による影響を検討した。

プラスチックシャーレに細胞 (MC3T3-E1) を単層培養し、2日後のプラズマ照射直前に培養液を捨ててプラズマを細胞に直接照射した。

照射時間の違いによる細胞増殖の評価と細胞の観察を行った。また剥離した細胞を別のシャーレに接着させる再接着能の評価を行った。

(3) プラズマ処理面の化学分析

(2) ①の実験で窒化により細胞付着数が増加する結果であったことから、シリコンシートに対してプラズマ照射を行い、確実なアミノ基導入(窒化)とそのXPS分析を行った。

これはシリコンシートなどの工業用品の場合その表面組成がほぼ確立されており、分析結果が容易に解釈可能なためである。

アミノ基の導入はアルゴンガスにて生成した大気圧プラズマに少量のアンモニアを導入し、プラズマ化したものをシリコンシートに照射することで行った。

(4) 生体内照射試験 (副作用試験)

ウサギ(白色家兎、オス、2.2-2.6kg)をケタラール (1-2ml/100g) およびセラクター (1-2ml/100g) で全身麻酔をかけ、左右の膝関節を切開し膝蓋骨を外側に翻転し、関節腔を露出し大腿骨関節面から垂直方向に1cmの部位にノズル先端を固定して、プラズマを180秒連続で照射した。

手術後1週で安楽死させ、関節腔の癒着の有無を観察した。大腿骨-脛骨関節の可動性が低下している場合を重度癒着とした。大腿骨-脛骨関節の可動性が保たれているが膝蓋骨-大腿骨関節の可動性が低下している場合を軽度癒着とした。可動性が全く障害されていない場合を癒着なしとした。

4. 研究成果

(1) プラズマ発生装置の調整

各材料に対して、酸化・窒化の影響について実験を行った結果、銅タングステンが最も劣化が少ないことが判った。

(2) 生物学的効果の検討

①シートへの照射

窒素プラズマ照射、無処理、酸素プラズマ処理の順で細胞付着数が多い傾向にあった。しかし、結果には大きなばらつきがあり、それぞれの群には統計学的有意差はなかった (図1)。

この結果を詳細に検討すると、プラズマ照射した場合には観察部位によって結果が大きく異なる傾向があった。これはプラズマ照射された径10mm程度の範囲においても、プラズマが不均一である可能性を示唆した。

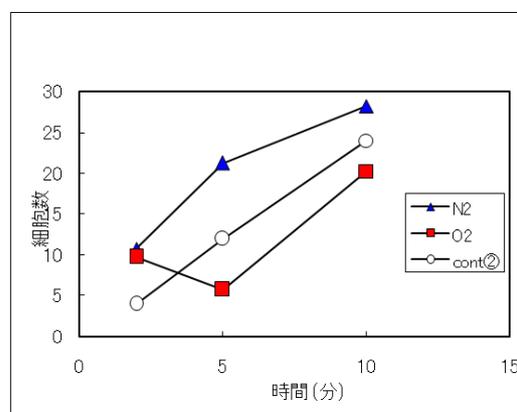


図1. 付着細胞数の時間的推移

②細胞への照射

15秒照射の場合には細胞増殖を確認できたものの、30秒照射の場合には、照射直後に細胞の70%が剥離し、細胞増殖は認められなかった。照射3日後の細胞は、付着している細胞であっても核や細胞の輪郭は不明瞭になっており、生物学的活動性は明らかに低下

していると推察された。また、照射直後には付着を保っていた細胞も時間とともに付着を失ったことから、付着していた細胞も生物学的には死んでいた可能性があると考えた。

60秒照射の場合には、照射直後に細胞の80%が剥離していた。細胞増殖は認められなかった。したがって、ほとんどの細胞は死んでいた可能性がある。

また剥離した細胞に対する再接着細胞の割合は0.02%と低かった。再接着しなかった細胞が死滅していたとは限らないが、従来から細胞培養時に行われている酵素処理に比べると、再接着率は極めて低い結果であった。

すなわち細胞自体へのプラズマ照射は設定条件によって細胞傷害を生じることが明らかになった。

(3) プラズマ処理面の化学分析

図2はシリコンシートへ大気圧プラズマ照射にてアミノ基の導入を行い、XPS分析を行った結果である。この分析結果はシリコンが窒化され、窒素のピークが出ていることを示している。この結果からアルゴンガスで生成した大気圧プラズマにアンモニアを導入することでアミノ基の生成、導入が可能であることが判った。

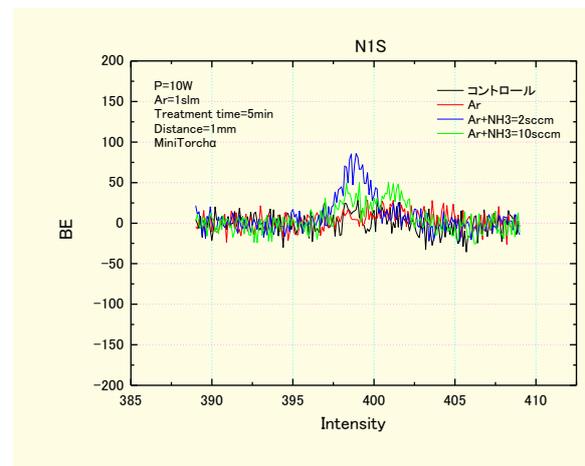


図 2. XPS 分析結果

(4) 生体内照射試験（副作用試験）

可動性による評価ではプラズマ照射による影響は検出できなかった。

そのほか関節軟骨組織に明らかな影響を生じていなかった。

すなわち生体内へ直接照射を行っても明らかな副作用を認めなかった。

以上の結果から人工物へのプラズマ照射が細胞接着を促進させること、生体内への直接的なプラズマ照射が安全であることが明らかになり、ハイブリッド半月板の作製や手術中の関節内組織照射による周辺滑膜細胞の誘導と組織修復を期待できると考えている。

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 件)

[学会発表] (計 件)

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑田 卓 (KUWATA SUGURU)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：80509000

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：