

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19894

研究課題名（和文）プラズマ荷電タンパク質溶液の医療用接着剤への新展開

研究課題名（英文）New development of a plasma-charged protein solution for medical adhesives

研究代表者

吉野 大輔（Yoshino, Daisuke）

東京農工大学・工学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：80624816

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、低温プラズマ反応流を用いて高度に荷電したタンパク質溶液（プラズマ荷電タンパク質溶液）の細胞接着性に優れる性質を応用し、医療用接着剤として臨床展開することを最終目標として研究を行った。研究期間内にプラズマ荷電タンパク質溶液の医療用接着剤としての性能を定量的に解析することはできなかったが、プラズマ荷電タンパク質溶液を用いた細胞接着機構とタンパク質溶液の荷電機構について大部分を明らかにすることができた。特にプラズマ処理によって、コラーゲン溶液の表面および界面の特性が電荷依存的に変化し、コラーゲン分子の全体構造には大きな変化を与えずに、局所的な構造及び会合状態が変化することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、これまでほとんど知られていなかったプラズマと生体分子（タンパク質）との相互作用が明らかとなり、プラズマによってタンパク質の機能をコントロールすることができる可能性を見出すことができた。この結果は、本研究の最終目標であるプラズマ荷電タンパク質溶液を医療用接着剤として応用展開するのみならず、タンパク質の状態が関係する薬品開発や病気のメカニズムの解明などにも応用展開が見込める。本研究の成果が、今後様々な研究分野へ波及する上で基礎的な知見として重要な役割を担うと考える。

研究成果の概要（英文）：This research was conducted with the ultimate goal of applying the excellent cell-adhesive properties of highly charged protein solutions (plasma-charged protein solutions) using a low-temperature plasma reaction flow and developing them clinically as medical adhesives. Although we were not able to quantitatively analyze the performance of plasma-charged protein solutions as medical adhesives within the research period, we were able to clarify most of the mechanisms of cellular adhesiveness using plasma-charged protein solutions and the charging mechanism of protein solutions. In particular, we found that the surface and interfacial properties of the collagen solution change in a charge-dependent manner by plasma treatment, and that plasma treatment changes the local conformation and association state of the collagen molecules without significant changes in the global structure.

研究分野：メカノバイオロジー、プラズマ化学、設計工学

キーワード：プラズマ 沿面放電 タンパク質 機能化 組織接着性 細胞接着性

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医療技術の進歩により、これまで治療困難であった疾病や外傷の外科手術が可能となった現在、患部の機能回復のみならず、患者の Quality of Life (QOL) の早期回復が重要な課題とされている。患部の機能回復が問題ないにも関わらず、手術創の慢性炎症の結果、ケロイド化や肥厚性瘢痕化が進み、傷跡が目立つように残った場合、完治後の患者の精神的負担が大きく QOL の低下は顕著である。形成外科的処置により傷跡を目立たなくすることは可能であるが、多大な金銭的負担が問題となっている。したがって、手術創の治癒促進とケロイド化や肥厚性瘢痕化を抑制する新規の治療技術の開発が切望されている。

我々はこれまでインプラント機器の生体親和性や組織結合性を向上させる新技術の開発に取り組んできた。低温プラズマ処理を施したタンパク質溶液を塗布することで、表面改質なしに細胞接着性と増殖性に優れる素材表面を実現できることがわかっている。このタンパク質溶液は、細胞塊同士の接着にも高い効果を発揮することが示されている (特許第 6408689 号、特許第 6713795 号)。また、溶液中のタンパク質及びその他の成分に対して特に制限がなく、様々な因子を混合することが可能といった特徴を有する。

これらの研究活動に基づき、プラズマ処理を施したタンパク質溶液を塗布することで対象に高い組織接着性と細胞増殖性を付加できることを見出した。このタンパク質溶液に炎症反応の抑制効果を付加し、医療用接着剤として応用すれば、手術創の治癒促進が可能となり、ケロイド・肥厚性瘢痕化の予防が実現できると着想を得て、本課題の申請に至った。

2. 研究の目的

本研究は、低温プラズマ反応流を用いて高度に荷電したタンパク質溶液 (プラズマ荷電タンパク質溶液) の細胞接着性に優れる性質を応用し、医療用接着剤として臨床展開することを最終目標とした。目標達成に向けて下記の3つの目的を設定した。

- (1) プラズマ荷電タンパク質溶液を用いた細胞接着機構を明らかにする。
- (2) プラズマ反応流によるタンパク質溶液の荷電機構を明らかにする。
- (3) プラズマ荷電タンパク質溶液の医療用接着剤としての性能評価を行う。

3. 研究の方法

(1) プラズマ荷電タンパク質溶液を用いた細胞接着機構

我々が開発したタンパク質溶液に低温プラズマ反応流を直接処理可能な放電装置 (図 1) を用いて、細胞外基質の主成分としてほとんどの臓器に存在する I 型コラーゲンを対象に、疎水性基質の細胞接着性向上効果の評価を行った。I 型コラーゲン (A10483-01, Gibco; 08-115, Merck) は最終濃度を $50 \mu\text{g/mL}$ として 20 mM 酢酸溶液に溶解させた。作製したコラーゲン溶液を 1 mL/min の送り速度で放電装置内に送り込み、プラズマ処理を施した。細胞接着性の評価には、疎水性基質であるシリコンコートカバーガラス (C2240, 松浪硝子工業) を用いた。プラズマを処理したコラーゲン溶液 (プラズマ荷電コラーゲン溶液) を疎水性基質に塗布し、風乾させた後に、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Cell Applications) を $4 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2$ の濃度で播種した。播種後 24 時間静置し、接着している細胞の数を計測することで細胞接着性を評価した。

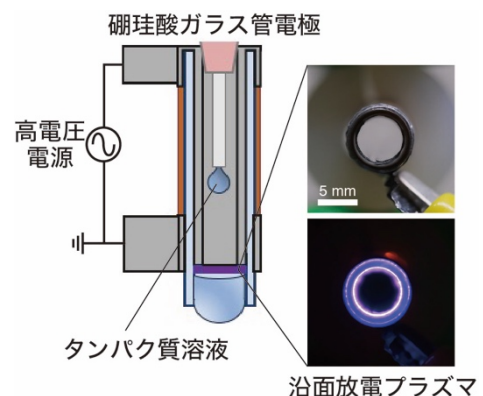


図 1 独自開発の沿面放電装置

(2) プラズマ反応流によるタンパク質溶液の荷電機構

プラズマ荷電コラーゲン質溶液の細胞接着性向上効果の原因を特定するために、プラズマ反応流による荷電がコラーゲン溶液にどのような影響を及ぼすか解析した。

① 化学種濃度の計測

プラズマによって溶液中に生成される化学種の濃度を吸光光度法によって定量分析した。

② 溶液の表面・界面特性計測

プラズマ処理による溶液の物性変化に着目し、疎水性基質上の濡れ性、表面張力及び粘度を評価した。濡れ性については、プラズマ処理前後のコラーゲン溶液を $1.5 \mu\text{L}$ 滴下し、基質上に形成した液滴の接触角を計測することで評価した。液滴の撮像には自動接触角計 (Smart Contact Mobile 4, エキシマ) を使い、 $1/20$ 法により接触角を算出した。また、毛管上昇法によりプラズマ処理前後のコラーゲン溶液の表面張力を測定した。プラズマ処理前後のコラーゲン溶液の粘度については、溶液の温度変化を $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 以内に調整しながら粘度計 (VM-10A, セコニック) により測定した。

③ コラーゲンの分子状態解析

プラズマ処理によるコラーゲン分子への影響に着目し、コラーゲン分子の二次構造、分子内・

分子間結合状態、分子会合状態を評価した。コラーゲン分子の二次構造については、円偏光二色性分光法を採用した。また、分子内・分子間結合状態の解析についてはラマン分光法を用いた。分子会合状態については、動的光散乱法によって分子集合体を粒子様の状態になっていると仮定した場合の粒子サイズを計測することによって評価した。

(3) プラズマ荷電タンパク質溶液の医療用接着剤としての性能評価

プラズマ荷電コラーゲン溶液が医療用接着剤として応用展開することが可能かを検証するために、人工的に構築した培養組織（細胞シート）の接着性の評価を試みた。培養組織に擬似的に設けた創傷部分にプラズマ荷電コラーゲン溶液を塗布・接着した後、一軸引張試験を組織が破断するまで行い、その時の破断荷重と伸びを計測することで接着性能の指標とすることを想定した。また、市販の万能試験機では定格荷重が大きく、組織破断荷重の精密な測定が困難であったため、位相差顕微鏡上で組織中の細胞動態を観察しながら、引張試験が可能な微小荷重力学試験装置を設計・試作した。

4. 研究成果

(1) プラズマ荷電タンパク質溶液を用いた細胞接着機構

プラズマ荷電コラーゲン溶液を疎水性表面に塗布した場合の細胞接着性を確認すると、プラズマ処理を施していないコラーゲン溶液を塗布した場合と比較して、接着する細胞が有意に増加することがわかった（図2）また、プラズマ荷電コラーゲン溶液を塗布した疎水性表面では、細胞がコンフルエント状態に到達するまで増殖することも確認できた。

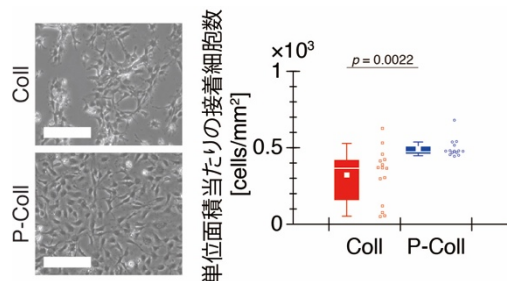


図2 プラズマ荷電コラーゲン溶液による疎水性基質の細胞接着性向上（Coll：処理なしのコラーゲン、P-Coll：プラズマ荷電コラーゲン、をそれぞれコートしたもの。スケールバーは200 μm を示す。）：プラズマ荷電コラーゲン溶液の塗布によって血管内皮細胞の接着性が優位に増加していることがわかる。15枚画像から算出（ $N=3$ ）

(2) プラズマ反応流によるタンパク質溶液の荷電機構

①化学種濃度

大気圧低温プラズマにより気相中に生成される反応性化学種は溶液に溶け込み、液中での化学反応を経て、主に過酸化水素、亜硝酸イオンおよび硝酸イオンに変化する。これらの生成される化学種の濃度によっては、医療用接着剤として利用する場合に生体に有害となることが懸念される。開発した放電装置によるコラーゲン溶液への低温プラズマ処理により生成される過酸化水素、亜硝酸イオンおよび硝酸イオンは、いずれの化学種においても1 mg/L以下という低い濃度であることがわかった（図3）。

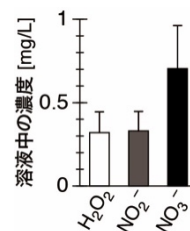


図3 コラーゲン溶液中に生成した化学種（Mean + S.D., $N=20$: 過酸化水素, 亜硝酸イオン; $N=5$: 硝酸イオン）

②溶液の表面・界面特性

表面と溶液との親和性を示す指標である接触角の変化を計測した。コラーゲン溶液の接触角は、溶液へのプラズマ処理終了後から300秒の間、減少し続けることがわかった。同様に、コラーゲン溶液の表面張力についてもプラズマ処理によって減少することが確認された（図4）。プラズマ処理によってコラーゲン溶液の粘度がわずかに上昇することも確認できた。

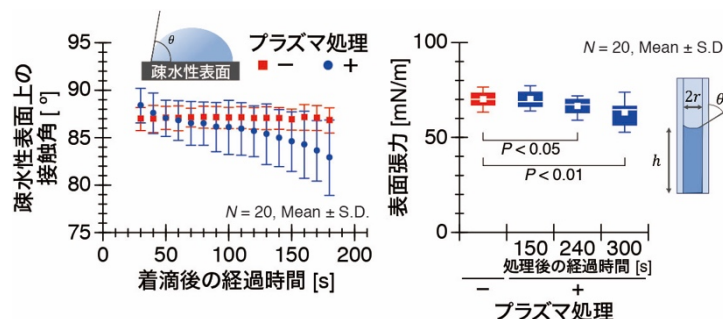


図4 プラズマ荷電によるコラーゲン溶液の表面・界面特性変化：プラズマ処理により電荷依存性の表面張力や接触角の減少が見られる。

以上の結果から、プラズマ処

理によってコラーゲン溶液の界面特性が疎水性表面との親和性が向上（濡れ性を向上）させるように変化し、疎水性表面の細胞接着性向上に寄与するとの結論に至った。その証拠として、プラズマ荷電コラーゲン溶液を塗布した疎水性のシリコンコートカバーガラスは、その表面に対して均一にコラーゲン分子がコーティングされていることが、コラーゲン分子の免疫蛍光染色によって明らかとなった。一方、プラズマ処理なしのコラーゲン溶液の場合は、コラーゲン分子

がコーティングされていない空隙がランダムに生じた。

③ コラーゲンの分子状態

プラズマ処理を施すことで液体中のコラーゲン分子の2次構造(図5)に変化はなかった。一方、コラーゲン分子の集合状態を粒子様の状態になっていると仮定した場合、粒子サイズが大きくなっていることから、分子の会合状態(図6)がプラズマ処理によって変化することがわかった。また、コラーゲンの分子内および分子間の結合状態を変化させることを確認した。コラーゲンにおいては、プラズマによって生成される化学種由来の変化とプラズマ荷電特有の変化が分離できており、ヒドロキシプロリンおよびプロリン周囲の水素結合状態にプラズマ荷電特有の変化が認められた(図7)。

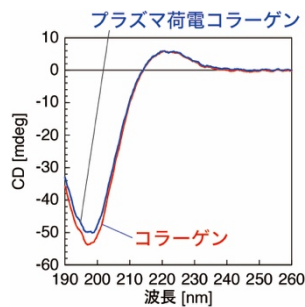


図5 コラーゲン溶液の円偏光二色性スペクトル: プラズマ荷電特有のコラーゲン2次構造変化はない。

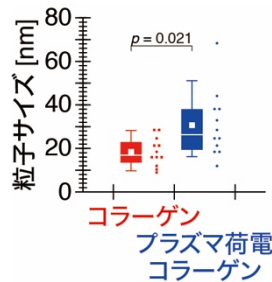


図6 動的散乱法によるコラーゲン分子の会合状態の変化: プラズマ荷電コラーゲンは有意に粒子サイズが増加。

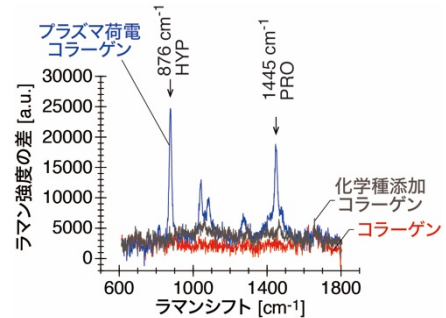


図7 プラズマ機能化コラーゲンのラマン分光波形: プラズマで生成される化学種と同濃度を溶液に添加したものと比較。ベースとなる酢酸のラマン強度を差し引いている。プラズマ荷電特有の変化(ヒドロキシプロリン(HYP)、プロリン(PRO)周囲の結合状態の変化)が確認できる。

(3) プラズマ荷電タンパク質溶液の医療用接着剤としての性能評価

組織や細胞シートなどに引張および繰り返し伸縮を一軸で負荷可能な微小荷重力学試験装置を試作した(図8)。前後駆動する電動アクチュエータ(Oriental motor)とロードセル(KYOWA)により、組織や細胞シートの引張特性を計測することが可能である。また、位相差顕微鏡のステージに取り付けることで力学試験中の細胞動態をリアルタイムに取得できる。測定系では、位相差顕微鏡のCマウント鏡筒にRaspberry Pi専用カメラモジュールRaspberry Pi High Quality Cameraを設置し、Raspberry Piに接続した。また、微小荷重ロードセルをArduino、Raspberry Piに接続した。制御系として、電動アクチュエータにドライバを介してPCに接続した。

組織を引張治具に固定する部分において、組織の損傷(切れ)が生じる問題が多く認められたため、今後は組織固定部分の構造をさらに改良する必要がある。研究期間中には、固定部分における組織の損傷を回避するためにPDMS製の薄膜の上に細胞シートを定着させて引張試験を行った。その結果、PDMS製薄膜と細胞シートそれぞれの引張強度を複合した特性値を計測することができた。しかしながら、PDMS製薄膜の強度が支配的となり、細胞シート自体の力学特性を独立して評価することはできなかった。(図9)。より精度の高い組織接着力の評価を行うためには、ロードセルの定格容量、組織固定治具の固定方法を検討し、さらなる改良を行う必要があるが、概ね設定した仕様を満足する性能の試験装置が開発できた。

研究期間内にプラズマ荷電タンパク質溶液の医療用接着剤としての性能、すなわち組織接着性の向上効果を定量的に解析することはできなかったが、プラズマ荷電タンパク質溶液を用いた細胞接着機構とプラズマ反応流によるタンパク質溶液の荷電機構について大部分を明らかにすることができた。今後は組織接着性の向上効果の検証を迅速に行い、プラズマ荷電タンパク質溶液の医療用接着剤としての応用展開の実現を達成させる。

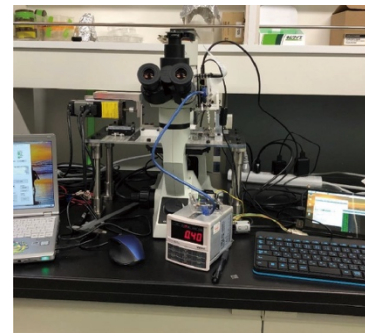


図8 設計・試作した微小荷重力学試験装置

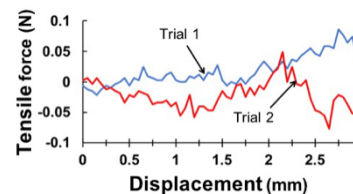


図9 細胞シートの引張特性の独立評価を試みた例: 細胞シートとPDMS製薄膜の複合特性からPDMS製薄膜の特性を減算したもの

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 田中 詩織, 吉野 大輔	4. 巻 47
2. 論文標題 プラズマ荷電タンパク質溶液の医療応用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 166-167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉野大輔
2. 発表標題 プラズマ荷電タンパク質溶液による医療器具の生体親和性向上
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオエンジニアリング講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中 詩織, 宮地 悟代, 吉野 大輔
2. 発表標題 プラズマ荷電タンパク質溶液の細胞接着性向上に対する特性評価
3. 学会等名 日本機械学会第31回バイオフロンティア講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shiori Tanaka, Daisuke Yoshino
2. 発表標題 Substrate Activation with Plasma-Treated Collagen Solution
3. 学会等名 13th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applicationa for Nitrides and Nanomaterials (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
研究協力者	田中 詩織 (Tanaka Shiori)		

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
---------	---------