

機関番号：15201

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791396

研究課題名 (和文) 大気圧低温プラズマによる骨折治療

研究課題名 (英文) Technological development of the atmospheric low-temperature plasma to treat the fracture

研究代表者

熊橋 伸之 (KUMAHASHI NOBUYUKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：00457178

研究成果の概要 (和文)：

プラズマによる骨表面化学構造変化においては、微細な変化を生じていた。プラズマ処理骨の骨細胞に対する効果においては、各条件下で骨芽細胞系培養細胞数に有意差を認めなかった。プラズマ処理骨の骨癒合に対する効果においては、非処理骨釘に比べ酸素プラズマ処理骨釘が良好な骨癒合と高い固定強度を獲得していた。

研究成果の概要 (英文)：

The effect of atmospheric low-temperature plasma on chemical structural change on bone surface was observed. The chemical composition on the surface was changed. The cell number of MT3T3-E1, which was cultured on the treated bone, was not significantly changed between the different conditions. The bone union and fixation strength of bone pin treated by O<sub>2</sub> plasma were gained compared to non plasma treated one.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：骨折、骨癒合、大気圧プラズマ、骨芽細胞、酸素、窒素

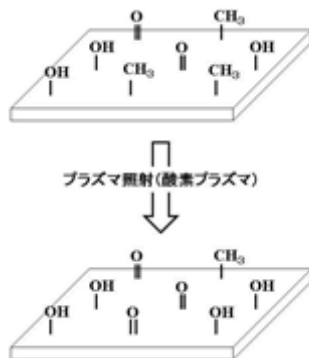
## 1. 研究開始当初の背景

通常骨折は固定すると数か月で骨癒合し治癒する。しかし、5-10%に癒合不全（偽関節）が生じることがわかっている。したがって、安全かつ効果的に骨癒合を促進できる薬剤や医療機器が望まれている。これまで超音波治療器や骨

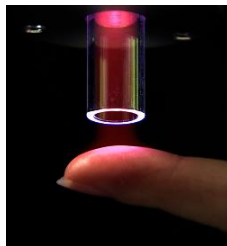
形成因子の投与が試みられているが、現段階で臨床効果は不十分である。

プラズマとは自由に動きうる電子とイオンが十分に存在し、全体として電荷の総和がゼロの状態と定義される物質状態で

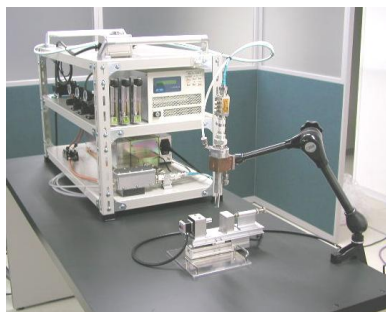
ある。これは高いエネルギーを有し、対象物に種々の科学的あるいは物理的変化を生じることができる。



一般的なプラズマ装置は低圧下に高温プラズマを生じるが、我々が保有する機器は大気圧下に低温プラズマを生成でき、理論上人体へ害なく照射できる。



プラズマ表面処理を生体へ応用した報告はないが、作用が表面に限局(数  $\mu\text{m}$ )し、加えて殺菌作用を有することから安全性は高く、技術的には機器の小型化も可能で手術機器へ応用できる。



そこで、プラズマ処理を骨折後の骨癒合促進に応用することを考えた。つまり、骨折部表

面にプラズマ処理を施すことで生物反応を促進し、骨癒合を促進させようとするものである。

## 2. 研究の目的

骨折治療に対するプラズマの応用を前提として、必要な基礎データを収集すること。

- (i) プラズマによる表面化学性状の変化を検出する。
- (ii) プラズマ処理骨の骨細胞に対する効果を検出する。
- (iii) プラズマ処理骨の骨癒合に対する効果を検出する。
- (iv) 骨癒合促進に有利なプラズマ条件を検索する。

## 3. 研究の方法

(i) プラズマによる表面化学性状の変化を検出する。

- ・材料：骨板(和牛皮質骨)
- ・プラズマ照射(電力：100W, 時間：1分)  
起動ガス：アルゴン 1slm  
反応ガス：酸素 0.1slm
- ・X線光電子分光(XPS)分析

(ii) プラズマ処理骨の骨細胞に対する効果を検出する。

- ・材料：骨板(和牛皮質骨)に骨孔を作製
- ・プラズマ照射  
(電力：150W, 時間：1分, 30分, 60分)  
起動ガス：ヘリウム 3slm  
反応ガス：酸素あるいは窒素 2slm  
上記ガスを1分、30分、60分間骨片に照射する。
- ・骨芽細胞系培養細胞(MTS3T3-E1) 上記骨片の上で4週間培養( $7.5 \times 10^2$ /dish)

・細胞形態、遊走能、分裂能をアクリジンオレンジ染色後、落射蛍光顕微鏡にて観察する。

(iii)プラズマ処理骨の骨癒合に対する効果を検出する。

・材料:骨釘(和牛皮質骨, 径 3 mm, 長さ 20 mm, オートクレーブ滅菌)

・プラズマ照射

(電力: 150W, 時間: 30 分)

起動ガス: ヘリウム 3slm

反応ガス: 酸素 2slm

・日本白色家兎大腿骨顆部にプラズマ照射骨釘を移植。対照として反対側に非処理骨釘を移植。術後 10 日で屠殺。

・マイクロ CT を撮像し微細構造 (仮骨形成) を評価。

・力学試験 (インストロン試験機)

・組織学的検討 (HE 染色)

(iv)骨癒合促進に有利なプラズマ条件を検索する。

・プラズマ条件

② 力: 100W, 150W

②照射時間: 1 分, 30 分, 60 分

③反応ガス: 酸素, 窒素

\*動物実験法は (iii) に同じ。

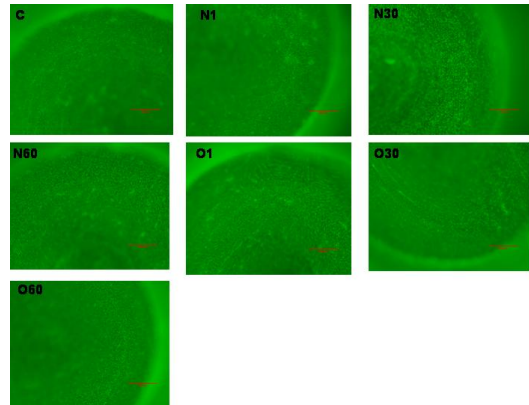
#### 4. 研究成果

(i)表面化学性状の変化

無処理骨板と比較し、プラズマ照射骨板は、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。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。

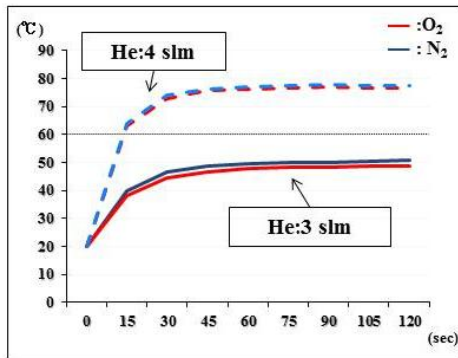
(ii)プラズマ処理骨の骨細胞に対する効果  
Control 群、照射 1 分、30 分、60 分 (ガス O<sub>2</sub>、N<sub>2</sub>) のいずれにおいても、骨片の骨孔内の骨芽細胞数には照射時間に比例して細胞数は多い傾向にあったが、有意差を認めなかった。



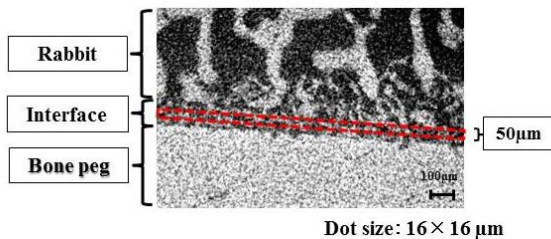
C:control(非照射群)、N1:N2 1 分間照射群、N30: N2 30 分間照射群、N60: N2 60 分間照射群、O1: O2 1 分間照射群、O30: O2 30 分間照射群、O60: O2 60 分間照射群

(iii)プラズマ処理骨の骨癒合に対する効果  
臨床とはなるが、骨釘は性状を統一するため和牛骨 (異種骨) を採用し、感染の可能性を最小限にするためオートクレーブを採用した。

プラズマ照射に関し、当初起動ガスアルゴンを用いていたが、プラズマ生成がより容易なヘリウムへ変更した。臨床使用を前提に生物活性を失活しない温度を想定し、流量を設定した。

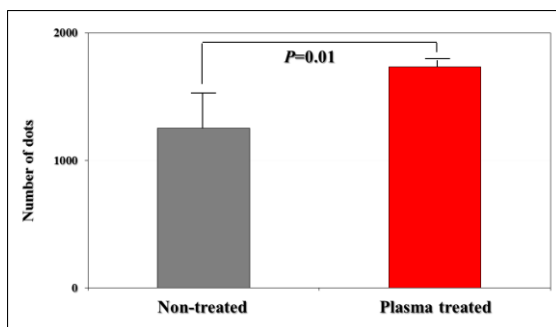


マイクロ CT では家兎海綿骨と骨釘の間に微細な架橋形成（仮骨）を認めた。



赤点線枠内が仮骨

間隙のうち、骨密度 700 mg/cm<sup>3</sup> 以上を強度に影響する仮骨成分と定義し、プラズマ照射群と非照射群で仮骨のドット数を比較したところ、前者で有意に多いことがわかった。



すなわち、プラズマ照射により仮骨形成が促進されていた。

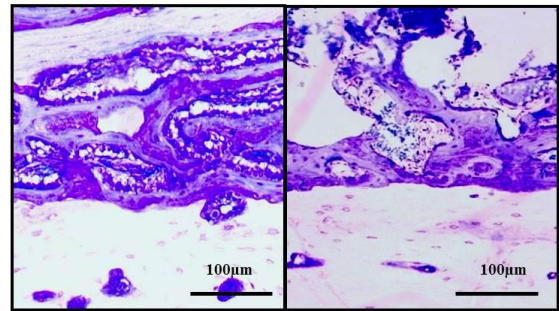
力学試験は、骨釘固定強度をインストロン引っ張り試験機により測定した。移植直後 (n=6) と術後 10 日 (n=10) でそれぞれ測定した。

|         | 非照射群           | プラズマ照射群        |
|---------|----------------|----------------|
| 術直後     | 0.13 ± 0.05 N  | 0.11 ± 0.07 N  |
| 術後 10 日 | 232.9 ± 86.8 N | 279.0 ± 71.6 N |

Statistical significance: n.s. (not significant) between groups at surgery; p=0.15 between groups at 10 days post-surgery.

上記の如く、有意差は認めなかったがプラズマ照射群で固定強度が高い傾向にあった。

組織学的にはマイクロ CT 同様、家兎海綿骨と骨釘の間を架橋する微細な骨組織を認めた。また、強度試験前後の比較では、架橋する微細な新生骨が破壊されていた。



試験前

試験後

以上から、プラズマ照射により骨間隙を架橋する仮骨形成は促進され、それは固定強度に直接影響を与えるものであり、したがって、術後固定強度が高くなる傾向を持つに至ったと考察した。

(iv)骨癒合促進に有利なプラズマ条件検索

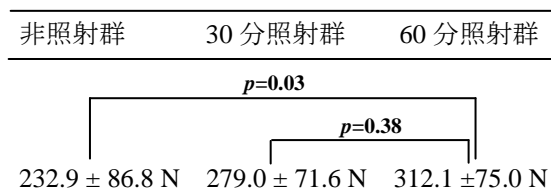
#### ①電力

理論上、電力に比例し安定したプラズマを生成できる。一方で高電力は熱を生じるため、生体使用では上限が必要となる。上述のように、電力 150W でヘリウム 3 slm を用いた場合、タンパク変性を生じない上限の温度 (約 50 度) となることから、電

力は 150W を選択した。

## ②照射時間

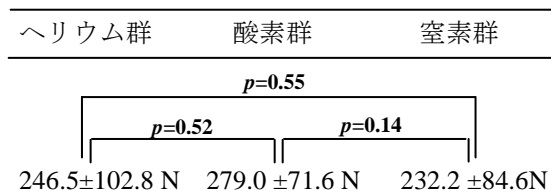
細胞培養の結果、30分と60分において照射した群が、非照射群および1分照射群に比較し、細胞数が多い傾向にあった(ii図)。したがって、酸素プラズマ30分照射群(n=10)と同60分照射群(n=10)でin vivo実験を行い術後10日の固定強度を比較した。



30分照射群と60分照射群間では後者で強度が増加する傾向を認めたが有意差はなかった。一方、非照射群と60分照射群間では有意に後者が高い強度を示した。

## ③ガス種

反応ガス種による変化を比較した。起動ガスをヘリウム3slmとし、反応ガスとして酸素あるいは窒素各2slmを加えた。対照としてヘリウム3slm単独群を設定し各群10例施行した。



群間に有意差は検出できなかったが、酸素プラズマで高い強度を示す傾向を認めた。ヘリウム単独群では結果のばらつきが多かったが、これは空気と混ざることによって毎回比率の異なるプラズマガスが生じたことが可能性としてかんがえられた。

以上から、現段階では電力150W、起動ガスにヘリウム3slm、反応ガスに酸素2slm、照射時間1時間が、実用可能な範囲の至適なプラズマ

条件と考えている。しかしながら、各因子を種々に組み合わせることで、更に実用的で効果的な条件が見つかる可能性がある。したがって、継続して研究を続ける必要がある。

## 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0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

熊橋 伸之 (KUMAHASHI NOBUYUKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 00457178

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

片岡 裕子 (KATAOKA HIROKO)

島根大学・医学部・特別協力研究員