

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592186

研究課題名(和文)半月板損傷治癒をもたらす生体接着剤とプラズマ照射法の開発

研究課題名(英文)Development of the treatment for meniscal tear with a novel biocompatible adhesive and plasma surface treatment.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：膝関節の半月板無血行野の断裂に対する有効な治療法はない。そこで生体接着剤とプラズマを用いた新しい修復法を考案し、その有効性を調査した。

結果、酒石酸架橋剤 - ヒト血清アルブミン(DST-HSA)接着剤が半月板断裂に対する治療法に役立つ素材のなる可能性が示された。一方今回調査した条件のプラズマ表面処理ではDST-HSA接着力への有意な効果は認めなかった。しかし条件次第では効果を発現する可能性は十分あり、さらに調査を進める必要があると考える。

研究成果の概要(英文)：There is no available treatment for meniscal tear of an avascular zone. To resolve this issue, we devised new technique with the novel adhesive (DST-HSA) and plasma surface treatment, and investigated the effectiveness of this technique.

In conclusion, DST-HSA adhesive may be available material to treat a meniscal tear in an avascular zone. Under the condition of this study, on the other hand, plasma surface treatment had no effectiveness to enhance the adhesion strength of DST-HSA. However, we believe that the study of the plasma surface treatment for meniscal repair should be continued because it has a possibility of becoming an available technique to treat the meniscal tear depending on the condition.

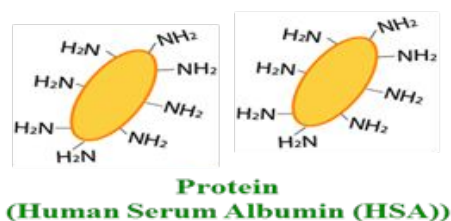
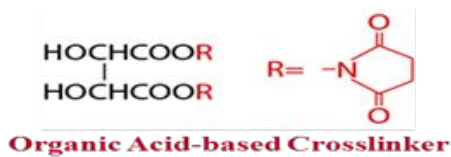
研究分野：医学 整形外科

キーワード：半月板損傷治療 生体接着剤 プラズマ表面処理

## 1. 研究開始当初の背景

膝関節の半月板無血行野の断裂に対する有効な治療法はないのが現状である。特に損傷部が水平や横あるいは複合断裂ではその治癒を導くことは極めて困難である。したがって、これまではこの部位の断裂は殆どが部分切除術の適応となり、その結果膝関節は半月板の衝撃吸収や安定作用を失うことになり、変形性膝関節症を招来する危険性がある。そこで、生物学的治癒が困難な半月板無血行野断裂に対して、生体接着剤とプラズマを用いた新しい修復法を考案した。

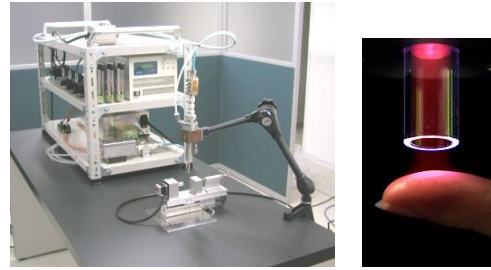
現在臨床応用されている組織接着剤では十分な接着強度や生体親和性を確保できないので、共同研究者の田口が開発した新しい接着剤 (Disuccinimidyl tartrate – human serum albumin: DST-HSA) に着目した。本剤は生体親和性が高く、申請者らが行った予備実験でも反応性炎症は認めなかったが、一方で接着強度は臨床応用を前提とする上で十分な強度ではなかった。



### DST-HSA

他方プラズマ表面処理では、表面の微細形状変化や表面への活性基付与を生じること

がわかっている。



### 大気圧下プラズマ装置 He プラズマ

そこで、半月板断裂部表面に対するプラズマ表面処理は接着剤との反応を変化させ、接着力が向上する、という仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

半月板無血行野断裂に対して、生体接着剤とプラズマを用いた新しい半月板修復法を開発すること。

- 1) *In vitro* で半月板修復のための生体由来架橋剤の至適濃度とプラズマの条件を解明する。
- 2) *In vivo* で半月板修復のための最適 (有効かつ安全) な生体由来架橋剤の至適濃度とプラズマ条件を解明する。

## 3. 研究の方法

- 1) 生体接着剤の *in vitro* 至適条件の検索  
DST-HSA 接着剤の至適濃度検索

・材料：豚半月板

DST-HSA 接着剤

・濃度変化：DSA 0.05, 0.075, 0.1 mmol

HSA 38, 40, 42 w/v%

着強度評価

・材料：豚半月板

DST-HSA 接着剤

対照接着剤

## フィブリン系接着剤

## シアノアクリレート系接着剤

### ・接着実験

半月板断裂モデルを作製し、上記接着剤を塗布。5分後に1回引っ張り試験を実施。

### デリバリーシステムの検討

ブタ半月板縦断裂モデルを作製し、縫合のみ施行した群、DST-HSAで接着後縫合した群、DST+HSAで接着後DST-HSA添加縫合糸で縫合した群、の3群間で固定強度を比較。

## 2) プラズマ照射効果の検索

### ・材料：ポリエチレンテレフタレート (PET)

### ・プラズマ照射

運搬ガス 種類：ヘリウム (He)

流量：4 slm

反応ガス 種類：酸素 (O<sub>2</sub>)

流量：2.2 slm

電力：150W

曝露時間：60秒

### ・解析法：X線光電子分光分析

## 3) 生体接着剤の *in vivo* 至適条件の検索

### ・対象：日本白色家兎

### ・手術と評価

膝関節を切開し内側半月板前角の

無血行野に5mmの縦断裂を作製。

左右両側に作製し、一方はDST-HAS

を塗布し接着。

術後3ヵ月で標本を採取し、力学試験

および組織評価を実施。

## 4) 生体接着剤およびプラズマ処理併用による接着効果の検索

### a. *In vitro* 実験

接着強度評価

### ・材料：豚半月板，DST-HSA

### ・プラズマ照射

運搬ガス：He 4 mls、反応ガス：O<sub>2</sub> 2.2 mls

電力：150W

曝露時間：60秒

### ・対照処理

ガス種，流量，温度を同一に調整した温風を同時間曝露。

### ・強度試験

曝露直後に0.1 mmol DST + 42w/v% HSAを塗布し断裂部を接着。引っ張り試験で接着強度を測定。

### 細胞への影響の検証

### ・材料：家兎半月板由来線維軟骨細胞

### ・プラズマ照射

運搬ガス：He 4 mls

反応ガス：O<sub>2</sub> 2.2 mls、NH<sub>4</sub> 10 mls + N<sub>2</sub> 2 mls

電力：150W

曝露時間：15、30、60秒

### ・ウェルコーティング

フィブロネクチン (F群)

アルブミン (A群)

未処理 (N群)

### ・細胞評価

プラズマ処理直後に細胞を散布し、1時間後の接着細胞数を比較。

### b. *In vivo* 実験

### ・対象：日本白色家兎

### ・プラズマ照射

運搬ガス：He 4 mls、反応ガス：O<sub>2</sub> 2.2 mls

電力：150W

曝露時間：60秒

・ 対照処理：温風処理

・ 手術と評価

膝関節を切開し内側半月板前角の無血行野に 5 mm の縦断裂を作製。

左右両側に作製し、一方はプラズマ処理、他方は温風処理を施した。いずれも DST-HAS を塗布し接着。

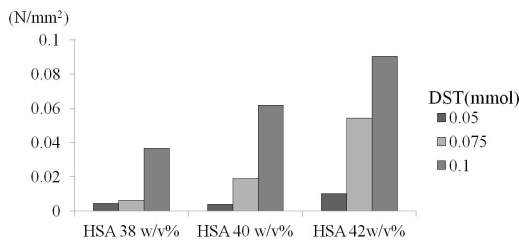
術後 1、2、3 カ月で標本を採取し、力学試験および組織評価を実施。

#### 4 . 研究成果

1) 生体接着剤の *in vitro* 至適条件の検索

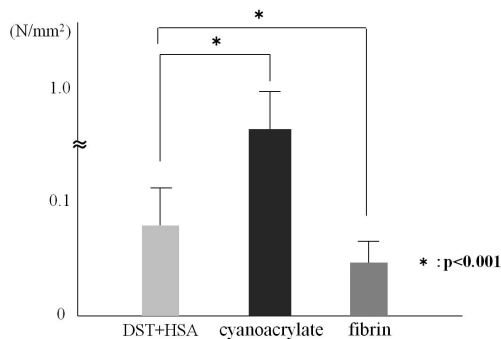
DST-HSA 接着剤の至適濃度検索

DST0.1mmol、HSA42w/v%時に接着強度が最大。以後の実験ではこの濃度を使用。



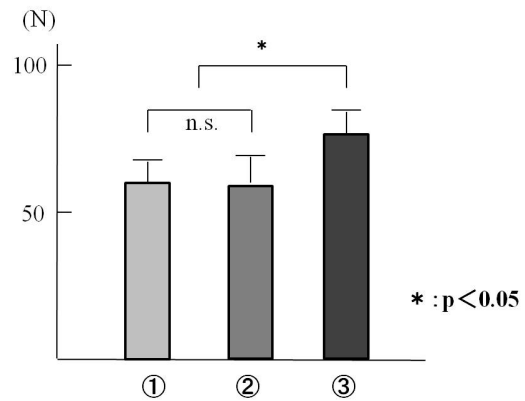
着強度評価

シアノアクリレート系接着剤には劣るものの、フィブリン系接着剤に対しては約 2 倍の接着強度を示した。



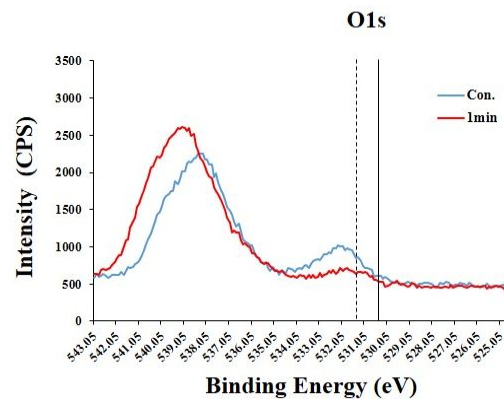
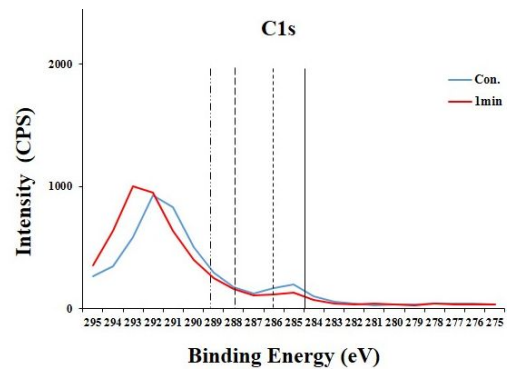
#### デリバリーシステムの検討

DST + HSA 添加縫合糸群が有意に高い強度を示した。

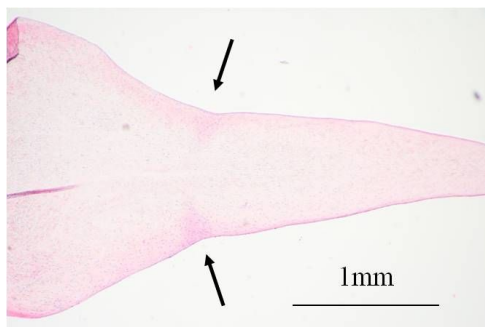


2) プラズマ照射効果の検索

酸素プラズマ曝露群では非曝露群に比較し、わずかではあるものの、酸素および炭素を示す結合エネルギーの減少を認めた。プラズマ表面処理により少なくとも何らかの変化が起こることがわかった。



3) 生体接着剤の *in vivo* 至適条件の検索  
 半月板接着部の強度は未治療群の 1.5 倍の強度を示した。組織評価では異物反応を認めず、半月板接着部は生物学的に癒合していた。この結果から本剤は生体内において短期的には異物反応を惹起せず生物学的癒合を阻害しないことが判明した。



術後 3 ヶ月時半月板 (HE 染色)

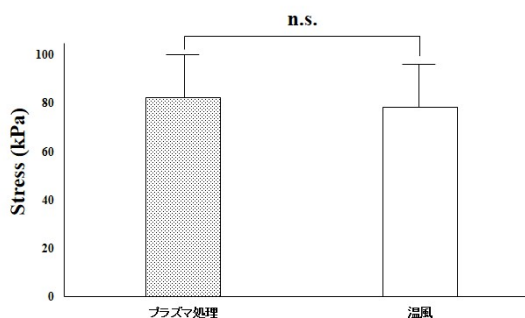
(↑) 断裂部

4) 生体接着剤およびプラズマ処理併用による接着効果の検索

a. *In vitro* 実験

接着強度評価

酸素プラズマ処理による有意な効果は認めなかった。



細胞への影響の検証

A 群のプラズマ処理 30 秒および 60 秒において、細胞接着数が多い傾向を示したが、サンプル間誤差が大きく普遍的な現象と断定するには至らなかった。

F 群 細胞数 (/mm<sup>2</sup>)

	非処理	15 秒	30 秒	60 秒
O <sub>2</sub> プラズマ	21	31	47	11
NH <sub>4</sub> プラズマ	224	140	168	142

A 群 細胞数 (/mm<sup>2</sup>)

	非処理	15 秒	30 秒	60 秒
O <sub>2</sub> プラズマ	73	29	128	224
NH <sub>4</sub> プラズマ	117	111	139	186

b. *In vivo* 実験

術後 4 週ではプラズマ処理群で治癒が促進される傾向を認めた。8 週および 12 週では両群に差を認めなかった。

まとめ

本研究では、DST-HSA が半月板損傷に対する治療を行う上で有用な素材になる可能性を示すことができた。一方で DST-HAS の効果を増強するようなプラズマ表面処理の条件を見つけ出すことはできなかった。

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 2 件)

Takahito Inoue, Tetsushi Taguchi, Shinji Imade, Nobuyuki Kumahashi, Yuji Uchio, Effectiveness and biocompatibility of a novel biological adhesive application for repair of meniscal tear on the avascular zone, Science and Technology of Advanced Materials, 査読有、13 巻、2012、064219 (5pp)  
 DOI: 1468-6996

井上 尊人、田口 哲志、熊橋伸之、桑田卓、

内尾祐司、生体接着剤を用いた半月板無  
血行野断裂修復法の力学的効果、日本整  
形外科学会雑誌、査読有、85 巻、2011、  
S1135

〔学会発表〕(計1件)

井上尊人、田口哲志、熊橋伸之、桑田卓、  
内尾祐司、生体接着剤を用いた半月板無  
血行野断裂修復法の力学的効果、第26  
回日本整形外科学会基礎学術集会、2011  
年10月20日、ペイシア文化ホール(前  
橋市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

〔その他〕

特記事項なし

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

田口 哲志 (TAGUCHI Tetsushi)  
独立行政法人物産・材料研究機構・生体機  
能材料ユニット・MANA 研究者  
研究者番号：70354264

(3)連携研究者

なし。