

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24760029

研究課題名(和文)安全かつ効果的な同種骨移植骨を可能にするプラズマ処理

研究課題名(英文) Application of the atmospheric plasma surface treatment for allogenic bone grafting: Safety improvement and enhanced bone healing.

研究代表者

今出 真司 (Imade, Shinji)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10581077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：同種骨に対する高温加圧滅菌が骨癒合能に与える影響を定量評価し、同滅菌骨に対するプラズマ表面処理が低下した癒合能を回復するかどうか調査した。

結果、ガス滅菌に比較し、高温高圧滅菌では骨癒合能が約25%低下することが判明した。その差は酸素プラズマ1分の曝露により回復する可能性があるものの、低温で十分なラジカルを生成するプラズマ条件で安定した効果を示すには至らず、更なる調査を要するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： We evaluated the bone healing property of the autoclaved allogenic bone compared with the low-temperature sterilized allogenic bone quantitatively, and investigated the effect of the plasma surface treatment on it.

In conclusion, the bone healing capability of the autoclaved allogenic bone was decreased by 25% compared with the low-temperature sterilized allogenic bone. Oxygen plasma treatment of 1 minute may have a positive effect on bone healing of the autoclaved allogenic bone, but this phenomenon was not reproducible. We believe that the study of the plasma surface treatment for bone healing should be continued.

研究分野：医学 整形外科

キーワード：プラズマ表面処理 同種骨移植 高温加圧滅菌

様式 F-19

研究開始当初の背景

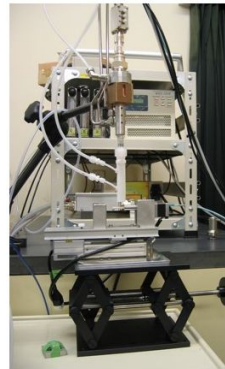
骨欠損を生じた骨折では、骨移植を必要とする場合がある。本邦では主に自家骨が用いられているが、健常部位を痛める方法は限界があり、代用するため人工骨や同種骨が使用されている。しかし、人工骨は生体材に比較し癒合能が劣り、場合によっては異物反応を示す。他方同種骨は安全面に不安を残すが、世界的に汎用されている骨移植材である。だが我が国では同種骨移植例は少ない。最大の要因は同種骨の安全性が確保されていないため、臨床における実用面からは、同種骨の欠点を克服することが非常に重要である。

安全な移植には安全な滅菌が必要である。現在ガス滅菌と高温加圧滅菌が主に用いられており、後者では完全な滅菌が可能となる。骨に対する同滅菌法では、初期強度が低下することはわかっているが、ガス滅菌処理骨と比較し経時的に癒合能変化を調査した報告はない。理論的には癒合能は低下するものと予測されるが、その程度は不明である。従ってまず精度が高い定量的な実験を行い正しい結論を導く必要がある。

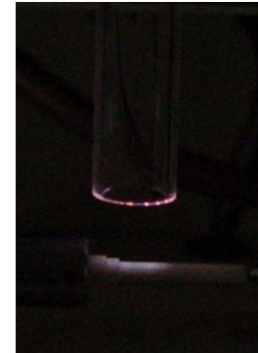
	長所	短所
高温加圧滅菌	完全な滅菌が可能	骨形成蛋白の熱変性
ガス滅菌	熱変性なし	不完全滅菌

表面の物理的加工が生体内での骨-金属間結合を促進する方法として一般的だが、申請者はこの物理的表面処理が骨移植では効果がないことを報告した。一方、申請者はプラ

ズマ処理と骨癒合の関係を調査し、骨癒合が促進する可能性があることを報告している。



大気圧下プラズマ装置



酸素プラズマ

そこで、高温加圧滅菌骨はガス滅菌骨と比較し、一定の割合で経時的骨癒合能が低下する、および、高温加圧滅菌骨にプラズマ処理を施すことで、低下した癒合能を再獲得できるという2つの仮説を立てた。

研究の目的

- 1) 高温加圧滅菌処理による骨癒合能への影響を正確な実験系を用い調査すること。
- 2) プラズマ処理による高温加圧滅菌処理骨の癒合能への影響を調査すること。

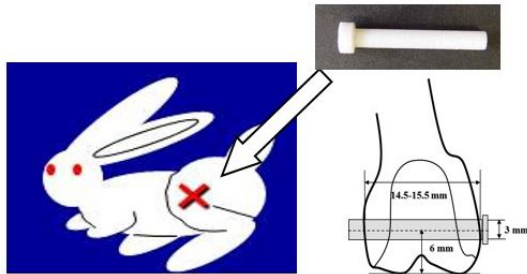
研究の方法

- 1) 滅菌法による骨癒合能の違い
骨釘作製
 - ・材料：牛骨、ポリ乳酸（PLLA）
 - ・サイズ：径 3.00 mm 長さ 20 mm滅菌処理
 - ・高温加圧滅菌（A群）：121度,30分
 - ・ガス滅菌（E群）：C₂H₄O,40度,8時間PLLA釘（P群）はガス滅菌のみ

動物実験

- ・対象：日本白色家兔
- ・手術

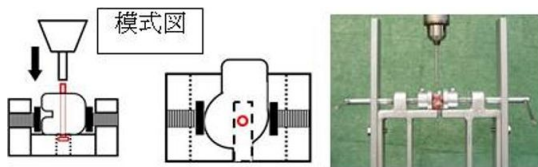
静脈麻酔下に家兔大腿骨顆部を展開、骨孔を作製し骨釘を挿入する。



評価

術直後、10日、14日で標本を採取。

- ・骨癒合部評価：マイクロCT (μ CT) で微細構造を評価
- ・力学試験：骨癒合強度を測定



2) プラズマ表面処理の効果

骨癒合能への効果

- ・骨釘：牛骨、径 3.00 mm、長さ 20 mm
- ・滅菌法：高温加圧滅菌もしくはガス滅菌
- ・プラズマ処理
高圧滅菌骨釘に対しプラズマ処理
運搬ガス 種類：ヘリウム (He)
流量：4 slm
反応ガス 種類：酸素 (O_2) および窒素 (N_2)
流量：2.3 slm
電力：150W
曝露時間：1、30、60 分
- ・対象：日本白色家兔

- ・手術法：実験 1 と同じ
- ・評価：標本は術後 10 日で採取
評価法は実験 1 と同じ

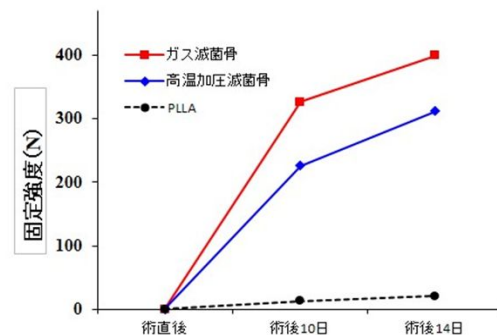
ラジカル検出実験

- ・プラズマ処理
ガス種：アルゴン
流量：4,10,20 slm
電力：150 W
- ・ラジカル評価
ラジカル試験紙
分光計

4. 研究成果

1) 滅菌法による骨癒合能の違い

- ・力学試験結果

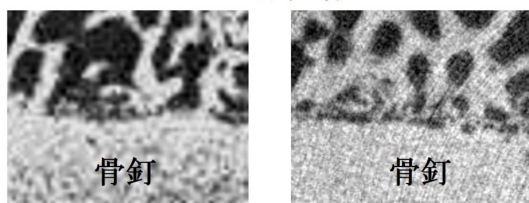


移植直後の固定力は3群間に差を認めなかった(A群 $0.30 \pm 0.09N$, E群 $0.25 \pm 0.05N$, P群 $0.33 \pm 0.08N$)が、術後10日ではA群 $226 \pm 42N$, E群 $326 \pm 62N$, P群 $14 \pm 6N$ 、術後14日ではA群 $312 \pm 20N$, E群 $400 \pm 56N$, P群 $21 \pm 8N$ といずれも各群間に有意差を認めた ($p < 0.01$)。

- ・ μ CT 結果

μ CT では、A および E 群において術後 10 日と 14 日のいずれも、骨釘と家兔骨の間に旺盛な新生骨梁形成を認めた。

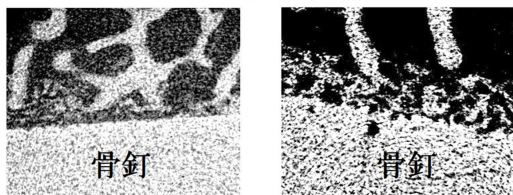
ガス滅菌骨



術後10日

術後14日

高温加圧滅菌骨

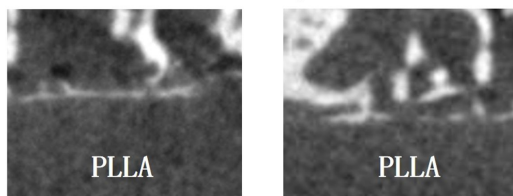


術後10日

術後14日

一方P群では間隙の新生骨梁形成はわずかであり PLLA 釘への微細骨梁の侵入は認めなかった。

PLLA釘



術後10日

術後14日

以上の結果から、加圧滅菌では低温滅菌に比較し骨癒合能が約 25%低下することが判明した。一方で加圧滅菌した骨釘でも PLLA 釘に比較し術後 14 日で 10 倍以上の固定強度を得ることも判明した。この事実は、骨が持つ骨形成タンパク質 (BMP) が滅菌による熱変性で失活しても、骨釘は PLLA 釘より固定材として優れていることを示唆していると考えられる。

2) プラズマ表面処理の効果

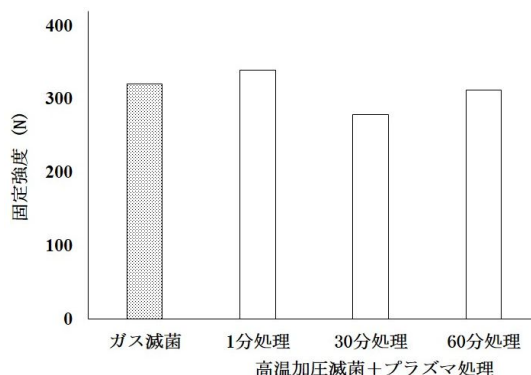
骨癒合能への効果

i. 酸素プラズマによる検証

ガス滅菌群の固定強度は $321 \pm 63\text{N}$ に対し、

高温高圧 + 酸素プラズマ処理群では 1 分処理で $340 \pm 23\text{N}$ 、30 分処理で $279 \pm 72\text{N}$ 、60 分処理で $312 \pm 75\text{N}$ であり、群間に有意差は認めなかった。

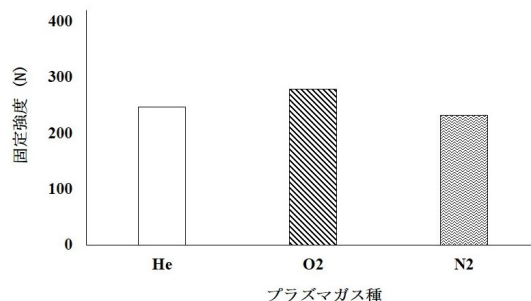
滅菌処理法の違いにより生じた癒合能の差 (実験 1 より) が、プラズマ処理を加えることで是正させる可能性があり、1 分処理が最もその傾向を持つことが示唆された。一方でサンプル間の個体差が大きく、本効果が普遍的なものかどうか結論づけるには至らなかった。



ii. ガス種が与える影響

異なるガス種のプラズマで効果が異なるか検証した。He 単独, O_2 、 N_2 で比較。処理時間は 30 分。

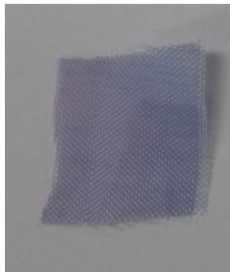
結果、He 群 $247 \pm 33\text{N}$ 、 O_2 群 $279 \pm 23\text{N}$ 、 N_2 群 $232 \pm 27\text{N}$ となり、群間に有意差は認めなかったものの、酸素で高い傾向を示した。一方で処理時間と同様個体差が大きく、こちらも結論を出すに至らなかった。



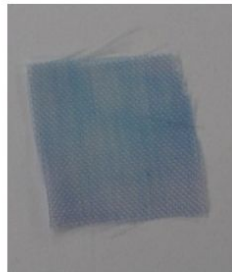
ラジカル検出実験

プラズマ実験において、これまでラジカルの有無を確認する方法が確立されておらず、本実験系においても、生成ガスに曝露した電極板が帯電したことをもってプラズマガスの存在を確認していた。

昨今それまで不可能だったラジカル検出が簡便にできる試験紙が開発された(湯地ら, 特願 2015-009622)ので、本試験紙を用いたラジカル検出試験を行った。結果、これまでのプラズマ条件におけるラジカル生成を確認することができなかった。一方 He 流量を 20L まで上げたところ試験紙が反応しラジカルを検出できた。



プラズマ曝露前



プラズマ曝露後

予備実験から、He4L 以上では生体へ曝露するには高温になる(50 度以上)になるため調整していたが、その流量では少なくとも本試験紙で検出できるレベルのラジカルを生成していないことが判明した。これまでの結果にサンプル間個体差が大きかった理由のひとつである可能性がある。

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 1 件)

今出 真司、内尾 祐司、骨釘に対するオートクレーブ滅菌の有用性：オートクレーブ滅菌とガス滅菌の比較、第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会、2012 年 11 月 26,27 日、名古屋国際会議場(名古屋市)

[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

今出 真司 (IMADE Shinji)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：10581077

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし