

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792324

研究課題名（和文）自己血漿と骨髄間葉系幹細胞を併用したハイブリッドマテリアルによる骨再生療法の検討

研究課題名（英文）Evaluation of bone regeneration using the hybrid materials of autogenous plasma and bone marrow mesenchymal stem cells

研究代表者

丸川 恵理子（MARUKAWA ERIKO）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：40419263

研究成果の概要（和文）：PPP、PRP、PRFをそれぞれイヌ抜歯窩に填入し、自己血漿中の構成成分の違いによる骨形成能の比較を行った。新生骨面積はPPP群が最大値を示し、PPP群、PRF群では対照群に比べて骨形成が促進されていた。また、イヌの背部筋肉内に β -TCPに濃縮骨髄穿刺液を含浸させ移植したところ、濃縮骨髄穿刺液に含まれる幹細胞が濃縮され、フィブリンを足場に異所性骨誘導能を有しているという結果が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study evaluated the effect of autogenous plasma and platelet-released growth factors to bone formation. PPP, PRP and PRF were implanted to each extraction socket in canine mandible. The amount of new bone formation was the highest in the PPP group, PPP and PRF could sufficiently maintain the bone width and height of the socket. β -TCP with bone marrow aspirate concentrate was implanted into the back muscle of dogs. This study indicated that BMAC comprises concentrated bone marrow stem cells and a fibrin scaffold that has the ability to induce ectopic bone formation

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：自己血漿、幹細胞、骨再生

1. 研究開始当初の背景

ラットやイヌの骨髄細胞は培養して細胞を増殖させても、ほぼ確実に骨分化能を維持させることが可能であったが、ヒトの骨髄細胞は増殖させても、骨分化能が維持されず、骨再生能の低い症例が認められた。培養する過程があることで、その課題は多く、臨床応用においていくつもの障害を乗り越えなければならぬ。本研究では、培養する工程を省

略し、非培養の新鮮MSCを効率よく多量に採取することができないかという発想に至った。われわれの研究結果でも、ウサギ頭蓋骨の骨欠損で比較し、骨髄穿刺液が骨形成を促進していることが示唆された。骨髄穿刺液により骨形成が促進されたが、それが何の作用で促進されたかは明らかではない。考えられるのは骨髄細胞（間葉系幹細胞）、含まれる

成長因子、骨形成の足場となるフィブリンの存在が挙げられた。また、われわれの研究では Platelet rich plasma (PRP)は、MSCs の細胞増殖能を著明に増加させるが、骨分化能は低下した。それに比べて、Platelet poor plasma (PPP)は骨分化能を低下させなかったため、骨再生における細胞の足場として使用したところ、PRP に比べて有意に骨形成を促進していた。血小板由来の成長因子には影響を受けず、血漿中のフィブリンが骨形成に優位にはたらく可能性を示唆した。

2. 研究の目的

現在、作製方法の違いによっていわゆる多血小板血漿の構成成分は様々であるが、その違いが骨再生にどのように影響するのか、詳細を明らかにすることが第1の目的となる。また、骨再生療法において細胞成分は重要な要素となるが、培養細胞を臨床で用いるためには多くの課題があり、すぐに臨床の場で使用できる方法を目指して非培養の自己骨髄間葉系幹細胞を多量に採取し、効率よく骨へと分化させる方法を確立することが第2の目的となる。これらの結果を踏まえて、血漿（フィブリン）をスキャフォールドとして骨髄間葉系幹細胞と組み合わせ、骨再生のための自己由来ハイブリッドマテリアルを確立することが本研究の最終目標となる。

3. 研究の方法

自己血漿中の構成成分の違いによる骨形成能の比較を行うにあたり、ビーグル成犬の抜歯窩治癒過程を検討した。下顎の頬側歯肉に歯肉縁切開を加え、粘膜骨膜弁を剥離翻転し、第3前臼歯を抜歯した。その後、ラウンドバーで抜歯窩頰側に歯槽頂より3mmの骨欠損を作製した。PPP、PRP、PRFをそれぞれ抜歯窩に填入し、対照として無処置群を加えた

4群で術後4週、8週で比較した。X線学的評価として、マイクロCTにて抜歯窩の舌側歯槽頂から3×5mmのROIを設定し、その選択した画像からROI内部の画像を抽出後、画像解析ソフトを用いて骨欠損部における新生骨面積、歯槽頂部より1.5mm下方の骨幅を計測した。PPP、PRP、全血それぞれのフィブリノーゲン量、血小板数を計測した。また、SEMを用いてPPP、PRF、PRPの観察を行った。

自家骨髄間葉系幹細胞の濃縮・分離法の確立のためにイヌ骨髄穿刺液を採取し、遠心分離して単核球細胞濃縮液を得る方法を検討した。ビーグル犬背部筋肉内にβ-TCPに濃縮骨髄穿刺液を含浸させ移植した濃縮骨髄群、β-TCPに骨髄穿刺液をそのまま含浸したものを移植した骨髄群、β-TCPをそのまま移植したTCP群で、術後3、6週（各N=8）の骨誘導能を比較した。濃縮骨髄群では抗凝固剤CPD2mlを含有した骨髄穿刺液13mlをβ-TCPと共に2500Gで15分遠心分離後、移植した。また、濃縮骨髄群と骨髄群で採取した骨髄穿刺液を1週間培養した細胞数を比較した。

4. 研究成果

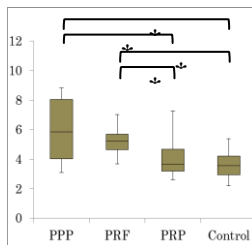
SEMによるフィブリンの形態はPPPとPRPが疎な網状構造を呈していたが、PRFは密な束状を呈しており、フィブリン重合がより強度である可能性が示唆された。

抜歯窩欠損歯肉の上皮化までの平均日数はPRF群、PRP群、対照群、PPP群の順に短い傾向を示した。術後4週における抜歯窩の新生骨面積はPPP群が最高値を示し、PPP群とPRF群がPRP群、対照群に比べて有意に高い値を示した。術後8週においても新生骨面積はPPP群が最大値を示した。

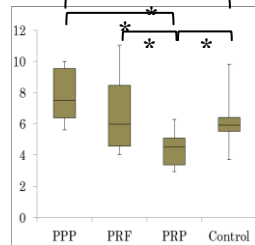
PRP群、PRF群は高濃度の成長因子の作用により抜歯窩の上皮化が早いと考えられた。

歯槽頂部での骨の形成に関して PRP 群は促進されなかったが、PPP 群、PRF 群では対照群に比べて骨形成が促進された。抜歯窩内部の骨の成熟は PRP 群、PRF 群の方が明らかに早く、作用部位の環境によって成長因子の効果が異なる可能性が示唆された。

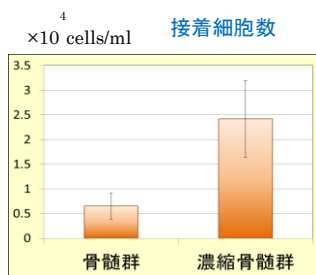
4 週



8 週

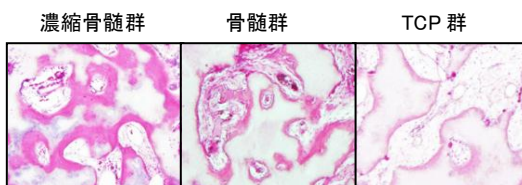


また、ビーグル犬の濃縮骨髄穿刺液の骨誘導能については濃縮骨髄群の骨髄細胞数は骨髄群と比べて平均 4.9 倍に増加していた。



移植後 3 週の平均新生骨面積値は濃縮骨髄群：0.79mm²、骨髄群：0.06mm²、TCP 群：0 mm² であり、6 週は濃縮骨髄群：1.96mm²、骨髄群：1.52mm²、TCP 群：0.61 mm² であった。移植後 3 週 6 週共に新生骨面積は濃縮骨髄群が最大値であり、TCP 群では最小値であり、濃縮骨髄群と TCP 群間で有意差が認められた。

6 週後



また、SEM 像にて TCP 上にフィブリンを足場に骨髄細胞が付着しているのが確認された。今回の方法は濃縮骨髄穿刺液に含まれる幹細胞が濃縮され、フィブリンを足場に異所性骨誘導能を有しており、臨床応用しやすい

安全かつ簡便で有用な方法である可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) 丸川恵理子 骨再生療法における platelet-rich plasma (PRP) の効果
第66回日本口腔科学会学術集会 2012年
05月17日～2012年05月18日 京都
- (2) 丸川恵理子 濃縮非培養自己骨髄細胞と β -TCPを用いた異所性骨誘導能の検討
第11回日本再生医療学会 2012年06月12日～2012年06月14日 横浜
- (3) 丸川恵理子 Evaluation of bone regeneration induced by uncultured bone marrow aspirate concentrate
10th Asian Congress on Oral and Maxillofacial Surgery 2012年11月15日～2012年11月18日 Bali, Indonesia
- (4) 丸川恵理子 幹細胞・フィブリン含有濃縮骨髄穿刺液を用いた骨誘導能の検討
第57回日本口腔外科学会総会 2012年10月19日～2012年10月21日 横浜
- (5) 畠山一朗 PPP(platelet poor plasma), PRP(platelet rich plasma), PRF(platelet rich fibrin)を用いたイヌ抜歯窩歯槽堤保存における比較検討 日本バイオマテリアル学会シンポジウム2012 2012年11月26日～2012年11月27日 仙台
- (6) 丸川恵理子 Bone regeneration using uncultured cells of bone marrow aspirate concentrate Osteology 2013年05月02日～2013年05月04日 Monaco
- (7) 丸川恵理子 The effects of autogenous plasma and platelet-released growth factors in bone regeneration Osteology 2013年

05月02日～2013年05月04日 Monaco

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丸川 恵理子 (Marukawa Eriko)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・講師

研究者番号：40419263

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：