

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462228

研究課題名(和文)凍結乾燥多血小板血漿を配合した新規人工骨の開発と脊椎手術への応用に関する研究

研究課題名(英文) Novel bone substitutes using Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma for spinal fusion surgery.

研究代表者

折田 純久(Orita, Sumihisa)

千葉大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：60638310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：新鮮多血小板血漿(platelet rich plasma:PRP)は組織修復や骨癒合に有効であるが、手術で用いる場合は成長因子半減期の短さから、術直前に一定量の採血が必須であり、患者侵襲や手間が問題となっている。我々は凍結乾燥保存によるPRPの長期保存法の可否を評価することに注目、8週間保存したPRP検体中に成長因子が維持されていることを確認した。さらに凍結乾燥PRPの実際の骨癒合促進効果に関して動物実験による検証を実施、新鮮PRPや欧米で使用されるBMPと同等の効果があることが示唆された。凍結乾燥PRPは骨癒合促進効果を有する保存可能な生体材料として今後の臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Fresh platelet-rich plasma (PRP) accelerates bone union in rat model. However, fresh PRP has a short half-life. We suggested freeze-dried PRP (FD-PRP) prepared in advance and investigated its efficacy on bone union in vivo. Spinal posterolateral fusion (PLF) was performed on 8-week-old male Sprague-Dawley rats, showing that FD-PRP accelerated bone union comparable to fresh PRP and BMP (human recombinant bone morphogenetic protein 2) by remodeling the bone with thinner but more tangled trabecular bone with rigidity. Histologically, the trabecular bone had thinner and more branches in the FD-PRP. And the biomechanical strength was high comparable to autologous bone. In conclusion, FD-PRP provides bone union ability comparable to fresh PRP and BMP, and can be prepared in advance safely and at low cost.

研究分野：脊椎外科

キーワード：多血小板血漿 新鮮凍結 骨癒合 組織修復

### 1. 研究開始当初の背景

腰椎変性疾患では、ADL および QOL を直接的に障害する大きな問題となるため当該部分の安定化を目的に脊椎固定術が行われる。別部位から採骨を行い、固定部に骨移植を行うことで骨癒合を図ることも多いが、採骨に伴う痛みや血腫・しびれなどが問題となり、患者の負担・苦痛を伴わない骨癒合促進を図る手段の追究が重要である。一方、人工的に骨癒合を促進する医療材料として開発され米国で採用されている BMP ( Bone Morphogenetic Protein )は優れた骨癒合促進材料として導入されているが、骨融解や発がん性などの問題点が指摘されその導入と使用については慎重になるべきとも提唱されている。腸骨採骨のような大きな骨切除を伴わず、かつ BMP のような人工物の介在しない方法としては術中局所骨や骨補填剤として Hydroxyapatite:HA が併用されるが、腸骨等の良好な骨源と比較すると骨癒合の程度および頻度は低下することが知られる。このような手法により、脊椎固定手術における手術部位の局所的かつ十分な固定効果が期待される一方、不十分な骨癒合は患者の患者の ADL や QOL の重大な障害に直結するため骨癒合促進の確実性の向上・効率化は急務である。申請者らはこのような命題に対して自己血漿の濃縮により得られる多血小板血漿 ( Platelet Rich Plasma: PRP )に着目してきた。PRP は豊富な成長因子・骨癒合因子を含み旺盛な組織修復能を持つことで知られ、患者自身の血液から精製可能であり感染や拒絶の危険性もないことから安全性も高いため形成外科・歯科領域での応用が報告されつつある。しかし骨癒合を目的とした整形外科領域での研究はあまり行われていない。我々は先行研究において PRP には骨癒合に有効な因子 (transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) や platelet-derived growth factor (PDGF))の濃度は有意に濃縮・上昇していることを示し、これを裏付けるようにラット脊椎固定術における PRP 投与は合併症なく有意に移植骨の骨癒合を促進することを報告している。さらに当院倫理規定に則って臨床における脊椎外科患者においても PRP が同様に骨癒合を有意に促進することをランダム化比較試験により報告、ヒトにおいても PRP が骨癒合促進をきたすことが実証された。申請者らはさらに、これまで人工骨補填剤として汎用されてきたハイドロキシアパタイトと PRP の併用が良好な骨補填と癒合をもたらす事も動物実験で報告した ( Kamoda, Orita, et al., Spine 2012 )。

### 2. 研究の目的

PRP は優れた骨癒合促進効果を持ち整形外科手術における骨癒合を促進する上で非常に有用であることが示唆される。しかしながら PRP の有効期限は作成後数時間程度と短く用事調製が必要であるため、緊急を要する

場面や頻回の使用は困難である。PRP の持つこのような問題点を克服するため、PRP を凍結乾燥することで長期保存を可能とする手法が報告された ( Pietramaggiore et al. Wound Repair Regen, 2006 )。これはコラーゲンなどの担体に PRP を添加した後に凍結乾燥し、一定期間の保存を可能にしつつ創傷治癒における被覆材として新鮮 PRP と同程度の効果が発揮できる新たな手法である。しかしコラーゲンを担体とした凍結乾燥 PRP は骨折手術への応用性には乏しく、骨補填の観点からも手術で応用するためには同分野で汎用される HA を担体とすることが望ましい。しかしながら HA を担体として PRP を骨癒合促進目的に使用・評価した報告はない。そこで今回我々は HA 担体に凍結乾燥多血小板血漿を添加した新規人工骨の有用性について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究計画では、以下の2つの研究を並行して行う

1.fPRP-HA の特性評価

2.fPRP-HA が骨癒合促進にもたらす効果

これらの予備実験から fdPRP-HA のもたらす骨癒合効果と安全性を確認した後、倫理委員会の承認のもとで臨床における脊椎固定手術患者に対する骨移植での評価を行う。

[平成 26 年度] :

凍結乾燥 PRP(fdPRP)および fdPRP-HA の特性と安全性を調査することを主な目標とする。

(1) 凍結乾燥させた新規人工骨の活性の検討  
本実験において、fdPRP-HA および fdPRP の活性と特性を調査し、有効性と適切な保存期間について検討する。申請者らにより報告された方法に準じラット血液による PRP を作成する (Kamoda, Orita, et al. J.Bone Joint Surg. Am. 2013)。

- ・ 8 週齢 Sprague-Dawley(SD)雄性ラット (n=7)から経心室的に採取した血液を遠心処理(3000rpm, 15min)

- ・ペレットとなった血小板を一度血小板成分に乏しい上清成分(PPP:Platelet Poor Plasma)と分離、500 mL の PPP と混合、PRP とする。

- ・最終的には 50mL のトロンビン溶解液 (1000U/ml in 100mM CaCl<sub>2</sub>)を実験 10 分前に PRP ,PPP に添加し血小板を活性化させ、PRP の溶解したゲルを作成する。

- ・PRP ゲルを HA/コラーゲン複合体に 10 分間浸漬した後、凍結乾燥する。

以上にて作成される fdPRP-HA についてその特性と活性を検証する。

比較対象として、PRP ゲルをそのまま凍結乾燥したもの(fdPRP)と、凍結乾燥させないPRP を併せて準備する。特に非凍結乾燥 PRP は対照群として用いる。

(2) 凍結乾燥させた新規人工骨の保存方法の

## 検討

実験 1)で作成した PRP を常温保存する群、-20℃にて保存する群にわけ同様の評価を行う。これにより保存方法による血小板数および成長因子の含有量を比較し、fdPRP-HA および fdPRP の活性が最も有効である保存方法を検討する

[平成 27 年度]：

上記で得られた fdPRP の特性と安全性を基に、動物実験における骨癒合促進評価を行う。

### (3) 動物実験による fdPRP-HA の骨癒合効果

#### ラット大腿骨骨折モデルによる評価

ラット大腿骨をリュウエルにて骨折させ、0.8mm の k-wire を挿入し固定する。固定部位に生食を留置した群と fdPRP-HA および fdPRP を留置した群を作成し(各 n=10)、移植直後、7 日、14 日、28 日における骨癒合の状態を単純 X 線および  $\mu$ CT 撮影を行い、組織 HE 染色画像により評価する。

なお、ラット大腿骨への fdPRP 留置が困難と判断された場合、使用動物腫としてウサギ(日本白色家兎)を用いる。下腿に創外固定器装着後、脛骨骨幹部に 5mm の全周性骨欠損を作製し骨折モデルとする。同種動物から作成した fdPRP-HA および fdPRP を骨折部に移植し、コントロール群としては骨折のみ群、vehicle 群として骨折部に同容積の PRP のみを添加した群を作成する(n=5)。これらの群に対し術後 1、2、3、4、6 週に同一個体の X 線撮影、及び  $\mu$ -CT 撮影を行い、骨癒合、および骨形成量を定量的に評価する。さらに術後 1、6 週にて脛骨を採取し HE 染色による組織切片を作成、骨癒合の状態を組織学的に評価する。

#### ラット脊椎固定モデルによる評価

ラット(n=30)脊柱両側の L4-L5 横突起間を露出し、以下 3 群に分け後側方固定を施行

##### 1) fdPRP 群

移植骨+fdPRP (n= 10)

##### 2) fdPRP-HA 群

移植骨+fdPRP-HA (n= 10)

##### 3) 非 PRP 群

移植骨のみ(n= 10)

固定術施行直後、1 週、2 週、4 週、6 週における単純 X 線画像と  $\mu$ CT 撮影、および各タイムポイントにおける骨移植部の HE 染色組織画像を比較評価する。特に  $\mu$ CT 画像においては骨癒合部分の面積を定量し各群間での比較検討を行う。

### (4) 臨床における fdPRP-HA の骨癒合効果

当院倫理委員会の承認を得た上で、腰部脊柱管狭窄症および腰椎圧迫症に対して腰椎後側方固定術の対象となる手術患者における fdPRP-HA の骨癒合に関する効果を調査する。具体的には患者を臨床試験部による第 3 者

無作為割り付けにて以下 2 群に分類する：

・ fdPRP 群：fdPRP-HA を局所骨と共に留置した群

・ control 群：HA のみを局所骨と共に留置した群

臨床試験における fdPRP-HA 作成手順は以下の通りである(Kubota, Orita, et al. 論文投稿中)

術前 7 日に外来にて自己血 400ml を採取する

二段階の遠心分離にて PRP を作成

清潔環境(ベンチレーター)下にて HA 顆粒(滅菌製品)に 10 秒間浸漬、そのまま滅菌環境下で凍結乾燥し、清潔環境下で-80℃で保存する。

上記にて作成した fdPRP-HA を、実際の手術の際に対象患者術野に粉碎局所骨とともに後側方に移植する。

術直後、1、3、6、12、18、24 ヶ月で単純 X 線(前後屈含む)および CT を撮影し、骨移植部の骨癒合を評価する。評価項目は単純 X 線での固定椎間の可動性(前後屈時の椎間角度)、CT における横突起間の骨架橋形成の状態、移植骨の CT 値変化を評価する。また、併せて患者 ADL・QOL 評価を行い、これらの項目においても両群間での違いを比較検討する。

[平成 28 年度]：

平成 26 年度、27 年度に得られた fdPRP の実験結果を基に、別アプローチで、その骨癒合促進効果を確認する。X 線、CT による画像的評価に加え、組織学的評価および力学的評価を追加し、癒合部の強度を客観的に評価する。

特に、組織学的評価に関しては、骨強度に大きく関わる骨梁構造に関して評価する。

また、ヒト血液から fdPRP を作成し、ラットで確立した同手法で成長因子が維持されているかを評価する。

動物実験における骨癒合促進評価を多視点から入念に行い、臨床試験の導入・開始にむけて準備する。

### ラット脊椎固定モデルによる評価

8 週齢雄性 SD ラットを使用(n=60)

L4-6 椎弓両側を展開し各移植材料を横突起間に移植した。各移植材料以下 6 群に群分けし、比較評価する。

#### 1) sham 群

展開のみ(n= 10)

#### 2) 自家骨群

自家骨：展開時の局所骨(n= 10)

#### 3) 人工骨単独群

HA のみ(n= 10)

#### 4) 人工骨 + freshPRP 群

HA+freshPRP

#### 5) 人工骨 + fdPRP 群

HA+fdPRP

#### 6) 人工骨 + BMP 群 (positive control)

HA+BMP

評価項目)

•骨癒合(単純X線)

固定術施行後,4週,8週で癒合,非癒合を評価する(脊椎外科医2名)

•組織学的評価(骨形成量,骨梁構造)

固定術後8週で骨移植部椎体を摘出し,HE染色で評価する.

主に骨強度に関わるリモデリング部の骨梁に関して,総面積割合,各骨梁の太さ,分岐数を計測する.

•力学的骨強度評価

術後8週の摘出椎体を3点曲げ法で力学的評価する.

以上を各群で比較検討する.

#### 長期保存したヒト fdPRP 中の成長因子の評価

健康ヒトボランティアより200ml採血(n=6)

ラットに準じた2回遠心法でPRPを作成

以下の3群に郡分けし保存する

1) 未処理常温保存群

2) 凍結保存群(-80℃)

3) 凍結乾燥保存群(常温保存)

上記3群において,PRP作成後2週,4週,8週で血小板数,成長因子を評価する.

成長因子はELIZA法で評価(Growth Factor Human Membrane Antibody Array kit (Abcam ab134002))代表的成長因子(PDGF, TGF- $\beta$ , vascular endothelial growth factor; VEGF, and epidermal growth factor; EGF)に関して定量化する.

#### 4. 研究成果

##### ラット脊椎固定モデルによる評価

固定術後4週において,人工骨単独群に比べfdPRP群で高確率に骨癒合所見がみられた.また,8週での骨形成量も有意に多い結果であった.

リモデリング部骨梁の特徴は,自家骨群で太く分岐が少なく,fdPRP群で,細く分岐が多い網目状であった.

fdPRP群の骨強度(112.0 $\pm$ 15.6N)は人工骨単独群(103.7 $\pm$ 30.1N)と比べ有意に強く(p<0.05),自家骨群(116.7 $\pm$ 10N)と有意差はなかった.

#### 長期保存したヒト fdPRP 中の成長因子の評価

ラット同様,ヒトにおいてもPRPは安定した作成が確立した.

•血小板数

未処理常温保存群では,2週の段階で測定不能となった.凍結群,凍結乾燥保存群は8週後も血小板数は保たれていた.

•成長因子

未処理常温保存群では,血小板数同様,2週で測定不能であった.凍結群,凍結乾燥保存群は8週後も各成長因子は維持されていた.しかし,凍結群において保存後8週で成長因

子が減量していた.

以上より,ヒトfdPRPは8週間成長因子が維持されることが示唆された.

以上より,fdPRPはfreshPRPや欧米で使用されているBMPと同等の効果があることが示唆された.

fdPRPは骨癒合促進効果を有する保存可能な生体材料として今後の臨床応用が期待される.

再生医療関連法の改正に伴う当施設の準備,整備に伴い,平成28年度内の臨床試験導入,開始は困難であった.

#### 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)

1. Shiga Y, Orita S, Kubota G, Inage K, Sato J, Yamauchi K, Eguchi Y, Aoki Y, Suzuki M, Sainoh T, Fujimoto K, Abe K, Kanamoto H, Takahashi K, Ohtori S. Freeze-dried human platelet-rich plasma retains activation and growth factor expression after an eight-week preservation period. Asian Spine J 2017. In press (査読あり)
2. Shiga Y, Orita S, Kubota G, Inage K, Sato J, Yamauchi K, Eguchi Y, Aoki Y, Suzuki M, Sainoh T, Fujimoto K, Abe K, Kanamoto H, Takahashi K, Ohtori S. Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma Accelerates Bone Union with Adequate Mechanical Rigidity Through the Formation of Multibranched Trabecular Bone in Posterolateral Lumbar Fusion Surgery Model in Rats. Scientific Reports 2016 Nov:36715 (査読あり)

[学会発表](計13件)

1. 志賀康浩 折田純久 山内かつ代 稲毛一秀 藤本和輝 阿部幸喜 金元洋人 井上雅寛 木下英幸 古矢丈雄 国府田正雄 高橋和久 大鳥精司

「ラット脊椎固定術モデルにおける長期保存凍結乾燥多血小板血漿の骨癒合促進効果の検討」

第 25 回日本脊椎インストゥルメンテーション学会

2016/10/28~2016/10/29

長崎 長崎ブリックホール

2. 志賀康浩 折田純久 山内かづ代 稲毛一秀 藤本和輝 阿部幸喜 金元洋人 井上雅寛 木下英幸 古矢丈雄 国府田正雄 高橋和久 大鳥精司

「ラット脊椎手術モデルにおける多血小板血漿の筋修復効果」

「ラット脊椎固定術モデルにおける長期保存凍結乾燥多血小板血漿の効果」

第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会

2016/10/13~2016/10/14

福岡 福岡国際会議場

3. 志賀康浩 折田純久 山内かづ代 稲毛一秀 藤本和輝 阿部幸喜 金元洋人 井上雅寛 木下英幸 古矢丈雄 国府田正雄 高橋和久 大鳥精司

「ラット脊椎手術モデルにおける多血小板血漿の筋修復効果」

「ラット脊椎固定術モデルにおける長期保存凍結乾燥多血小板血漿の効果」

第 24 回日本腰痛学会

2016/9/2~2016/9/3

甲府 富士屋ホテル

4. 志賀康浩 折田純久 久保田剛 鴨田博人 山内かづ代 稲毛一秀 西能健 佐藤淳 藤本和輝 木下英幸 高橋和久 大鳥精司

「ラット傍脊柱筋損傷モデルに対する PRP 局注の効果」

第 38 回日本疼痛学会

2016/6/24~2016/6/25

札幌 北海道立道民活動センターかでの

5. Shiga Y, Orita S, Kubota G, Yamauchi K, Inage K, Fujimoto K, Abe K, Kanamoto H, Inoue M, Kinoshita H, Takahashi Ka, Ohtori S

Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma Accelerates Bone Union with Adequate Mechanical Rigidity Through the Formation of Multibranched Trabecular Bone in Posterolateral Lumbar Fusion Surgery Model in Rats.

The 43th International Society for the Study of the Lumbar Spine

2016/5/16-2016/5/20

Singapore Marina Bay Sands Convention Center

6. 志賀康浩 折田純久 久保田剛 山内かづ代 稲毛一秀 西能健 佐藤淳 藤本和輝 阿部幸喜 金元洋人 高橋和久 大鳥精司

「長期保存した凍結乾燥多血小板血漿の骨

癒合促進効果に関する検討」

第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会

2015/10/22~2015/10/23

富山 ANA クラウンプラザホテル

7. 志賀康浩 折田純久 稲毛一秀 山内かづ代 藤本和輝 阿部幸喜 金元洋人 井上雅寛 木下英幸 高橋和久 大鳥精司

「長期保存した凍結乾燥多血小板血漿における成長因子の検討」

第 33 回骨代謝学会学術集会

2015/7/23~2015/7/25

東京 京王プラザホテル

8. Shiga Y, Orita S, Kubota G, Yamauchi K, Inage K, Sainou T, Sato J, Fujimoto K, Abe K, Kanamoto H, Takahashi Ka, Ohtori S

Freeze-dried human platelet-rich plasma retains activation and growth factor expression after an eight-week preservation period.

The 42th International Society for the Study of the Lumbar Spine

2015/6/8-2015/6/13

San Francisco USA, The Palace hotel

9. 志賀康浩 久保田剛 折田純久 山内かづ代 稲毛一秀 西能健 佐藤淳 藤本和輝 阿部幸喜 金元洋人 高橋和久 大鳥精司

「長期保存した多血小板血漿における成長因子の検討」

第 44 回 脊椎脊髄病学会

2015/4/16~2015/4/18

福岡 福岡国際会議場

10. 志賀康浩 久保田剛 折田純久 山内かづ代 稲毛一秀 西能健 佐藤淳 藤本和輝 木下英幸 高橋和久 大鳥精司

「長期保存した凍結乾燥多血小板血漿 (platelet-rich plasma) における成長因子の検討」

第 22 回日本腰痛学会

2014/11/15~2014/11/16

千葉 幕張メッセ

11. 志賀康浩 久保田剛 折田純久 山内かづ代 稲毛一秀 西能健 佐藤淳 藤本和輝 木下英幸 高橋和久 大鳥精司

「長期保存した凍結乾燥多血小板血漿 (platelet-rich plasma) における成長因子の検討」

第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会

2014/10/9~2014/8/10.

鹿児島 城山観光ホテル

12. 志賀康浩 久保田剛 折田純久 山内かづ代 稲毛一秀 西能健 佐藤淳 藤本和輝 木下英幸 高橋和久 大鳥精司

「長期保存した凍結乾燥多血小板血漿 (platelet-rich plasma) における成長因子の検

討」  
第 23 回日本脊椎インストゥルメンテーション学会  
2014/8/29～2014/8/30  
静岡 アクトシティ浜松

13. 志賀康浩 久保田剛 折田純久 鴨田博  
人 山内かづ代 稲毛一秀 西能健 佐藤  
淳 藤本和輝 木下英幸 高橋和久 大鳥  
精司

「PRP の臨床応用について」  
第 12 回整形外科痛みを語る会  
2014/06/28～2014/06/29  
福岡 萃香園ホテル

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 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 0 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

折田 純久 (ORITA, Sumihisa)  
千葉大学・大学院医学研究院・助教  
研究者番号：60638310

### (2)研究分担者

山内 かづ代 (YAMAUCHI, Kazuyo)  
千葉大学・医学部附属病院・特任助教  
研究者番号：30648069

### (3)研究分担者

大鳥 精司 (OHTORI, Seiji)  
千葉大学・大学院医学研究院・教授  
研究者番号：40361430