

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20589

研究課題名(和文) フリーズドライ技術を応用した血小板超濃縮液による新規骨再生法の開発

研究課題名(英文) Development of novel method for bone regeneration by super-concentrated platelet with freeze-drying technique

研究代表者

中谷 佑哉 (NAKATANI, Yuya)

長崎大学・病院(歯学系)・医員

研究者番号：50770822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、先行研究で行っていた多血小板血漿(PRP)の調製法に基づき、ドナーを追加して、そのPRP中の血小板濃縮度を算出して、調製法の再現性を確認した。また、PRP中の成長因子濃度もドナーを追加して測定を行い、その再現性を確認した。  
さらに、フリーズドライPRPの至適濃縮度および保存可能期間の検討を行った。  
濃縮度の検討は3倍を起点として4群を設定し、ヌードマウス頭蓋骨膜下移植モデルに移植実験を行ったところ、ある濃度において骨再生能が最も優れており、同様に保存期間の検討は保存1か月を起点として4群を設定したところ、ある時点までは保存1か月時とほぼ同等の骨再生能を維持可能であることが確認できた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated reproducibility of Platelet Rich Plasma (PRP) preparation protocol we used in previous study by calculating the concentrate rate of platelets from additional donor. In addition, we confirmed reproducibility of the result of growth factors concentration assay in PRP from them. Furthermore, we evaluated optimal enrichment factor and reservable period of freeze-dried PRP (FD-PRP).

In enrichment factor experiment, we set 4 groups beginning at 3-folds enrichment and then FD-PRP samples were onlay-grafted onto mice calvaria. As a result, a certain group was significantly superior in bone regeneration to other groups. Then, in reservable period experiment, we found FD-PRP stored for certain months could maintain the almost equal capability of bone regeneration compared with that stored for 1 month.

研究分野：骨再生

キーワード：多血小板血漿 骨再生

1. 研究開始当初の背景

血小板は、血管が損傷した際に周囲に凝集して傷口を塞ぐ無核の細胞成分であり、従来は凝固因子と共に止血を行うノリのような物質と考えられていたが、近年、血小板は血小板由来成長因子(Platelet-Derived Growth Factor: PDGF)、トランスフォーミング成長因子 (Transforming Growth Factor Beta: TGF-β)、血管内皮細胞成長因子(Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF)など多種類の成長因子を放出して積極的に創傷治癒を促進することが明らかになってきた。これに注目した研究者らは、血液中の血小板を濃縮し、組織再生誘導治療薬として用いる試みを始めた(Currie, Br J Cancer 1981; Lanas et al., Scand J Gastroenterol 1994)。多血小板血漿(PRP)は、遠心分離操作で血液中の血小板分画を血漿中に濃縮したものであり、血液の3~5倍程度の血小板を含む。このため、PRPには組織再生を促進する効果が期待でき、実際、PRPは骨折の治癒や皮膚の再生を促進することが示されている(Simman et al., Ann Plast Surg 2008; Redaelli et al., J Drugs Dermatol 2010)。歯科領域においては、1998年にMarxらによって顎骨再建治療への有用性が示されて以来(Marx et al., Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1998)、インプラントのための骨造成や歯周組織再生治療にも用いられるようになっており、PRPは歯科における再生医療においても重要なものとなりつつある。しかしながら、PRPの歯科応用は以下の理由(問題点)から広く普及するには至っていない。

**(1)採血手技に対する不安**: PRP調製には採血が不可欠である。しかし、口腔外科医などの一部の歯科医を除き、採血は歯科医にとって不慣れな処置であるためにPRPを導入しない歯科医も多い。

**(2)遠心分離機購入の必要性**: PRP調製には遠心分離機が必要であり、遠心分離機を備えている歯科治療施設は少ない。また、機械が安価ではないため、PRP導入のハードルの一つとなっている。

**(3)PRPは用事調製**: PRPは用事調製が基本であり、PRPを手術に用いるには手術当日に採血とPRPの分離操作を行う必要がある。血液からのPRP分離は市販キットを用いることで簡単に行えるが、採血からPRP調製まで1時間程度はかかる。この時間的制約からPRPを導入しない歯科医も多い。

**(4)PRPの臨床的效果に対する疑問**: PRPの骨再生治療に対する有用性を述べた報告は数多く存在するが、一方で、骨再生におけるPRPの臨床的效果に有意性がみられないとする報告も多く存在し、骨再生治療PRPの導入が積極的に行われていない現状が存在する。

以上の問題点は一般開業歯科医にとって大

きなハードルとなるが、病院所属の口腔外科医には(1)や(2)はほとんど問題にならない。しかし、PRPの調製を手術当日に行うことは診療効率の低下につながる。特に手術を2回、3回と行う場合は、その都度貴重な診療時間を割くことになるため、われわれとしてもできるだけ避けたい。そこで、PRPのフリーズドライ保存を応用すれば、患者からの採血は一度で済み、手術当日も予めストックしたPRPを復元するだけで使用できるため、診療効率を大きく向上することができる。さらに、(1)、(2)の理由でこれまでPRPを導入していない歯科医も病院口腔外科などにPRPの作製、凍結を依頼することで自院での手術にPRPを使用できるようになる。また、PRPは整形外科や美容外科など医科の分野においても注目の組織再生誘導治療薬であるため、PRP凍結保存法の開発は医科臨床の向上にも大きく貢献する研究といえる。

PRP凍結保存法の開発は、上記理由から医科、歯科共通の重要な課題であり、これまでもさまざまな試みがなされているが(Towell et al., Transfusion. 1986; Guillaumin et al., Am J Vet Res. 2008; Tarandovskiy et al., PLoS One. 2013)、これらの多くは細胞の凍結保存法に準じ、ジメチルスルフォキシド(DMSO)を使用するものである。DMSOには氷晶の形成を抑制する作用があるため、PRPにDMSOを添加すると凍結による血小板の傷害や破壊を防ぐことができる。しかしながら、DMSOには生体毒性があるため、これを使用して凍結したPRPを臨床に用いる際にはDMSOを除去する作業が必要になる。通常、DMSOの除去は洗浄操作(遠心分離による血小板成分の沈殿と上清の除去、生理食塩水などの洗浄液への再懸濁)を3回繰り返すことで行われているが、この操作には少なくとも30分程度の時間が必要であり、PRPを凍結保存するメリットは薄れてしまう。また、この洗浄操作を行うとPRP中のフィブリノゲンなどが失われてしまうため、PRPとしての効能が低下することも考えられる。さらに、この洗浄操作でDMSOが完全に除去できるかは不明であり、また、通常のPRPを調製する工程と同様の時間と人員を要し、添加物の遺残によるコンタミネーションが起こる可能性も存在する。よって、臨床に適したPRP保存法とは言えない。

そこで、われわれはPRPに添加物を加えず、PRPそのものをフリーズドライ保存するという着想に至った。フリーズドライ技術は食品を長期保存するために開発された方法であり、インスタントラーメンのように、この方法を用いて保存した物品はすぐに使用できるという大きな利点を持つ。そのため、成長因子などの生物製剤もフリーズドライ保存が主流になってきたが、造血幹細胞などの細胞製剤のフリーズドライ保存が難しいこと

もあって、PRP の保存にはこれまで用いられてこなかった。しかし、PRP の効能の本体は血小板中の成長因子とフィブリノゲンであるため、PRP の保存にフリーズドライが有効であり、臨床応用時の操作性を考慮しても使用時に PRP を再水和するのみであるため、非常に優れた保存法であるものと思われる。さらに、フリーズドライ PRP には溶解する際の水量を減じることで血小板超濃縮液を調製できるという利点も存在する。

研究代表者らは本研究の先行研究として、PRP のフリーズドライ保存法の検討を行い、その有用性と臨床的可能性を学会等の場で発表してきた。本研究では、血小板超濃縮液に関してさらなる検討を行うこととした。

## 2. 研究の目的

本研究は、フリーズドライ技術を応用した血小板超濃縮液による新規骨再生法の開発とその有用性を明らかにすることを目的とし、フリーズドライ PRP の臨床研究に向けた検討事項について明らかにしていくこととした。

## 3. 研究の方法

### (1)PRP 中の血小板濃縮度の再現性の検討

前述の臨床研究に向け、先行研究で用いた PRP 調製法の再現性について検討を行った。

そこで本研究では、ドナー数を追加して末梢血と PRP 中の血小板数を測定し、血小板濃縮度を算出して、PRP 調製法の再現性を確認した。

先行研究では、血小板濃縮度は  $6.36 \pm 0.10$  であった。

### (2)フリーズドライ PRP 中の成長因子濃度の再現性の検討

血小板濃縮度の検討と同様、PRP 中の成長因子濃度に関して、新鮮 PRP とフリーズドライ PRP の成長因子濃度の比較を、ドナーを追加して行い、その再現性を確認した。

先行研究では、PDGF、TGF- $\beta$  はフリーズドライ後もその濃度が維持されており、3 倍濃縮フリーズドライでは VEGF も含め、ほぼ濃縮度通りの成長因子濃度を示していた。

### (3)血小板超濃縮 PRP の骨再生至適濃度の検討

先行研究で行ったヌードマウス頭蓋骨膜下移植モデルの評価で、新鮮 PRP と等倍フリーズドライ PRP の骨再生促進能に有意差はなく、3 倍濃縮フリーズドライ PRP は等倍フリーズドライ PRP よりも有意に骨再生を促進することが判明した。

そこで本研究では、フリーズドライの濃縮度に焦点を当てた移植実験を行った。

濃縮度を 3 倍を起点として、A 倍、B 倍、C 倍、D 倍の 4 群を設定し、ヌードマウス頭蓋骨膜下移植モデルを用いた骨再生能の評価

を行った。濃縮フリーズドライの調製は、加水による還元時に加水量を 1/A、1/B、1/C、1/D 量にすることによって行った。

### (4)フリーズドライ PRP の保存可能期間の検討

先行研究で行ったヌードマウス頭蓋骨膜下移植モデルの評価で、新鮮 PRP とフリーズドライ処理後 1 か月保存した PRP の骨再生促進能に有意差はないことが判明した。

そこで本研究では、フリーズドライによる PRP の保存可能期間にも焦点を当てた移植実験を行った。

保存 1 か月を起点として、A か月、B か月、C か月、D か月保存の 4 群（上限を 2 年とした）を設定し、上記のヌードマウス移植実験モデルを用いて骨再生能の評価を行った。

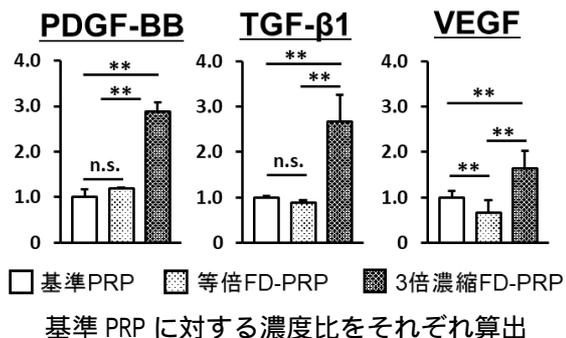
## 4. 研究成果

### (1)PRP 中の血小板濃縮度の再現性の検討

追加ドナー（7 名）の血小板濃縮度は  $6.71 \pm 0.55$  であり、PRP 調製法の再現性が認められた。

### (2)フリーズドライ PRP 中の成長因子濃度の再現性の検討

追加ドナー（3 名）の成長因子濃度は PDGF、TGF- $\beta$  ではフリーズドライ後もその濃度が維持されており、3 倍濃縮フリーズドライでは VEGF も含め、ほぼ濃縮度通りの成長因子濃度を示していた。よって、先行研究の結果と同様であり、その再現性が認められた。



### (3)血小板超濃縮 PRP の骨再生至適濃度の検討

H-E 染色を用いた組織解析によって、とある濃縮度 X において、移植時の操作性、骨再生能に関して最も優れた所見を得た（ドナー 3 名分すべて同傾向）。よって、この濃縮度 X 倍を至適濃縮度とした。（特許出願準備中）

### (4)フリーズドライ PRP の保存可能期間の検討

上記と同様の組織解析によって、とある保存期間 X までは保存 1 か月のフリーズドライ PRP とほぼ同等の骨再生能を維持できることが確認できた（ドナー 3 名分すべて同傾向）。よって、フリーズドライ PRP 保存可能期間を X か月とした。（特許出願準備中）

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 1 件)

Nakatani Y, Agata H, Sumita Y, Koga T, Asahina I: Efficacy of freeze-dried platelet-rich plasma in bone engineering. Archives of Oral Biology (査読あり). Vol.73: 2017, 172-178  
DOI:  
10.1016/j.archoralbio.2016.10.006

[学会発表](計 4 件)

朝比奈 泉, 中谷 佑哉, 江頭 寿洋, 野田 さわこ, 大場 誠悟, 住田 吉慶: 歯科インプラント治療における再生医療の適応, 第 17 回日本再生医療学会総会, 神奈川県横浜市, 2018 年

中谷 佑哉, 大場 誠悟, 朝比奈 泉: 上顎洞の形態が上顎洞底挙上術による骨造成術に与える影響, 第 35 回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会, 福岡県北九州市, 2018 年

中谷 佑哉, 大場 誠悟, 田島 暢崇, 野田 さわこ, 朝比奈 泉: 上顎洞底挙上術施行時に同時埋入したインプラント体の術後安定性に関する臨床的検討, 第 34 回日本口腔インプラント学会九州支部学術大会, 熊本県熊本市, 2017 年

Nakatani Y, Agata H, Sumita Y, Koga T, Asahina I: Efficacy of Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma on bone engineering. 14th annual meeting on International Society for Stem Cell Research, San Francisco, U.S.A., 2016 年

[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]なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中谷 佑哉 (NAKATANI, Yuya)  
長崎大学・病院(歯学系)・医員  
研究者番号: 5 0 7 7 0 8 2 2

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者

朝比奈 泉 (ASAHINA, Izumi)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

住田 吉慶 (SUMITA, Yoshinori)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

古賀 喬充 (KOGA, Takamitsu)  
長崎大学・病院(歯学系)・助教