

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：82729  
 研究種目：基盤研究(C) (一般)  
 研究期間：2017～2020  
 課題番号：17K11561  
 研究課題名(和文) 口唇口蓋裂に対する多血小板血漿/フィブリンと臍帯幹細胞を用いた顎裂骨形成法の開発  
  
 研究課題名(英文) A development of alveolar bone formation with platelet rich plasma/fibrin and umbilical stem cells technique for cleft lip and palate patients  
  
 研究代表者  
 小林 眞司 (kobayashi, shinji)  
  
 地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長  
  
 研究者番号：90464536  
 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口唇口蓋裂における顎裂部の骨形成を促進させるために、多血小板血漿/フィブリン(platelet rich plasma/fibrin:PRP/F)移植術を再生医療新法下で行った。その結果、PRF移植群が高い骨形成能を持つことが明らかとなった。骨形成の機序を解明するために乳児骨膜細胞を用いた結果、PRP添加群の方が乏血小板血漿(PPP)添加群よりも高い増殖能と骨分化能を有していることが判明した。さらに、T細胞機能欠如ラットの顎裂部に骨欠損を作製し、PRPの移植を行うことに成功した。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

乳幼児におけるPRP/F移植術は世界的にも報告がなく、かつPRF移植術が口唇口蓋裂における顎裂部の骨形成を高めたことは患者にとって極めて有用なことである。自己末梢血から採取され、副作用や合併症はなく極めて高い安全性を有している。PRP/Fの機序の一部を解明できたことは今後のPRP/F研究にとって有益であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：platelet-rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) were grafted to accelerate bone formation in alveolus of cleft lip and palate patient under the act on the safety of regenerative medicine issued by the Ministry of Health, Labour and Welfare. As the result, there were no problems in all patients. The concentration of cytokine in PRP/F tended to be higher than in peripheral blood, though there were great differences between individuals. Radiological evaluations for new bone formation performed five years postoperatively showed significantly better results in patients who had PRF implantation. The effects of PRF could be related to the fibrin networks of PRF serving as an osteoconductive scaffold, inducing fibrin remodeling and collagen secretion. Meanwhile, in vitro, PRP facilitated the proliferation of human infant osteoblast cells, but histologically facilitated the bone differentiation.

研究分野：形成外科

キーワード：多血小板血漿 多血小板フィブリン 口唇口蓋裂 骨形成

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口唇口蓋裂に対して10歳頃に行う顎裂部骨移植術 (alveolar bone graft:ABG) は腸骨から骨を採取するために患児に肉体的・精神的負担を強い。我々はこの問題を解決するために、口唇形成術時に顎裂部を閉鎖する手術である歯肉骨膜形成術 (gingivoperiosteoplasty:GPP) を同時に行ってきた。本手術は、顎裂部の骨形成を促進させ、その後の ABG を回避させることが可能であるが、ABG の回避率は約 60%であった。狭い顎裂部では良好な骨形成を得られるが、広い顎裂部では十分に骨形成ができないことが推測された。このようなことから、顎裂部への骨形成を促進する移植材料の必要性が高まってきた。移植材料の中でも多血小板血漿/フィブリン (platelet rich plasma/fibrin:PRP/PRF) は、血小板の顆粒に含まれている PDGF, TGF- $\beta$ , EGF, VEGF などのサイトカインを脱顆粒させることで皮膚や骨組織に関して治癒促進効果を期待するものであり、骨欠損部に移植すると骨形成が促進されることが報告されている。

### 2. 研究の目的

我々はさらに口唇口蓋裂における顎裂部の骨形成を促進させるために、臨床的には、歯科領域などで広く応用されている PRP/F と GPP を組み合わせた方法を再生医療新法下 (計画番号 PC3150413) で行う。一方、基礎的には、PRP/F と骨形成の関連を調べるために試験管内において乳児骨膜細胞を用いて骨形成の機序を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) CT における PRP/F 移植後の顎裂部骨形成の臨床評価

当センター倫理委員会の承認下で GPP を行った唇顎口蓋裂 57 例を対象とした (表 1)。広い顎裂や歯槽の不整に対して術前顎矯正を行った後に GPP を行った。PRP は、10mL の抹消血を採取し、2 回遠心法により作製した後にゼラチンスポンジ (ゼルフォーム®) に含有させて移植した。PRF は、自家静脈血を試験管に 10mL 採取し、400G 10 分間行い、移植した (図 1)。同時に末梢血及び PRP/F 中の血小板と液性因子の濃度を計測した。液性因子は、血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor:PDGF)、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor:VEGF)、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- $\beta$ :TGF- $\beta$ )、トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- $\alpha$ :TGF- $\alpha$ ) の濃度を計測した。顎裂部骨形成の評価は、移植 5 年後に CT にて行った (神奈川県立こども医療センター倫理委員会 承認済)。

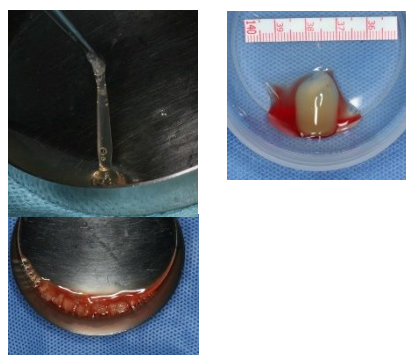


図1 左上：PRP、左下：ゼラチンスポンジに含有させた PRP、右：PRF

表 1 症例リスト

	全患者	非移植群	PRP 移植群	PRF 移植群
症例	57	17	23	17
男児/女児	34/23	8/9	16/7	10/7
移植時年齢 (m)	5.7 $\pm$ 1.4	5.2 $\pm$ 1.9	5.6 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 1.0

#### (2) in vitro における自家 PRP の骨膜細胞への挙動解析

ヒト乳幼児骨膜細胞 (human infant periosteal cells:hiPC) の培養は、採取した粘骨膜組織を PBS で洗浄後、実体顕微鏡下で骨膜組織と粘膜組織に分離した。骨膜組織のみミンスリ Glutamax, ascorbic acid, antibiotic antimyotic, fetal bovine serum (FBS) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) の培地中に播種し、インキュベーター (37 $^{\circ}$ C、CO $_2$  5%) に 1 週間静置した。0.25% トリプシン-EDTA 溶液にて骨膜細胞の継代を行い、トリパンブルー液を用いて生細胞数を計測した。次に、hiPC の増殖能および骨への分化能の検討を行った。

具体的には 24well プレートに  $3 \times 10^4$  cells/well を播種し 2 日間培養後に PRP を添加した。0, 2, 9, 16, 23, 30, 37, 44 日目に細胞数を測定し、24 日目に骨分化能を評価するためにアリザリン染色による組織学的解析を行った。

( 3 ) PRP 移植のための顎裂欠損マウスにおける条件の最適化

PRP のための欠損範囲の決定などの最適化を行う。具体的には、犬歯付近に骨欠損を作製し経時的に観察する。自然治癒までの日数が長いモデルを選択する。

( 4 ) 顎裂欠損マウスモデルへの PRP 移植

顎裂欠損 NOD/SCID マウスに PRP を移植し、CT を含めた画像的および組織学的解析を行う。具体的には、PRP 移植群、非移植群に分けて骨形成を確認する。移植後、2, 4, 8, 12, 24 週に CT にて顎裂部の骨形態を画像解析するとともに、組織切片を作製し組織学的に骨形成を評価する。

4 . 研究成果

( 1 ) CT における PRP/F 移植後の顎裂部骨形成の臨床評価

唇顎口蓋裂の顎裂骨欠損部に対して PRP/F を移植することにより骨形成を促進させることを目的とし、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」下に「PRP/F による再生医療」を行い、全 57 症例で手術直前に自己血液を採取することができ、術中の不具合はなく安全に施行することができた。また、感染などの術後合併症もなかった。

PRP 中の血小板とサイトカインの濃度は、血小板： $93.5 \pm 35.7 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 、PDGF： $12709 \pm 2476.2 \text{ pg/mL}$ 、VEGF： $1362.1 \pm 764.4 \text{ pg/mL}$ 、TGF- $_1$ ： $68.5 \pm 5.5 \text{ ng/mL}$ 、TGF- $_2$ ： $903.7 \pm 275.5 \text{ pg/mL}$ であった。一方、末梢血中の血小板とサイトカインの濃度は、血小板： $39.1 \pm 10.7 \times 10^4 / \mu\text{L}$ 、PDGF： $7803.8 \pm 1809.0 \text{ pg/mL}$ 、VEGF： $497.6 \pm 151.7 \text{ pg/mL}$ 、TGF- $_1$ ： $26.3 \pm 7.7 \text{ ng/mL}$ 、TGF- $_2$ ： $389.3 \pm 53.3 \text{ pg/mL}$ であった。末梢血中よりも PRP 中の濃度の方が高値であった( 図 2 )。

5 歳時の CT 撮影では、全ての症例で顎裂部に骨形成を認めた。

CT による顎裂部骨形成の評価に関しては、移植 5 年後の骨欠損部の体積は、非移植群： $256.0 \pm 64.2 \text{ mm}^3$ 、PRP 移植群： $302.2 \pm 67.4 \text{ mm}^3$ 、PRF 移植群： $197.6 \pm 88.8 \text{ mm}^3$ であり、統計学上有意に PRF 移植群の骨欠損体積が少なかった。また、非破裂側( 健側 ) 骨からみた破裂側( 患側 ) 顎裂部骨体積の割合( 骨形成率 ) は、非移植群： $80.2 \pm 6.4\%$ 、PRP 移植群： $77.2 \pm 4.9\%$ 、PRF 移植群： $86.0 \pm 5.0\%$ であり、統計学上有意に PRF 移植群の骨形成率が高かった。

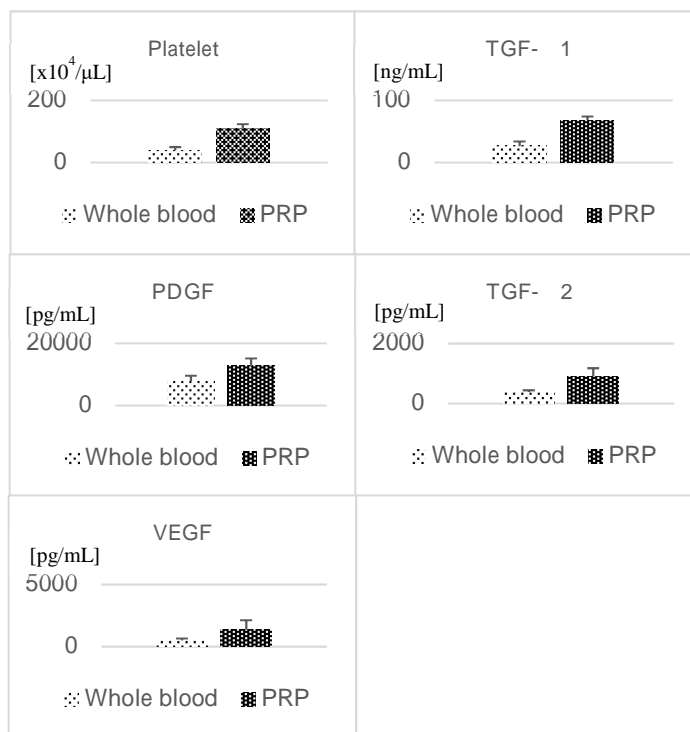


図 2 末梢血と PRP の血小板濃度と液性因子の濃度

( 2 ) in vitro における自家 PRP の骨膜細胞への挙動解析

hiPC の培養の結果から hiPC は、極めて高い増殖能を有していた。FBS 非存在下において PRP 添加群の方が乏多血小板血漿( platelet poor plasma:PPP ) 添加群よりも高い増殖能を有していた。5%PRP 添加群では添加後 2 日目から 5%PPP 添加群と比較して hiPC の増殖能が高くなり添加

後 30 日目にほぼ平坦な状態となった。さらに PRP および PPP 添加群ともに 1%PRP 添加群は 5%PRP 添加群と比較して高い増殖能は示さなかった。FBS 非存在下において PRP と PPP を添加しないネガティブコントロール群ではほとんど細胞増殖が認められなかった (図 3)。

骨への分化能に関しては、PRP 添加群では石灰化沈着を示すアリザリン染色陽性であったが、PPP 添加群では染色されなかったことから、PRP 添加群の方が骨分化能が高いことが組織学的に示唆された。さらに、in vitro において細胞上清の組織学的解析を行った結果、PRP 添加群では I 型コラーゲンで染色されたが、PPP 添加群では染色されなかった (図 4)。

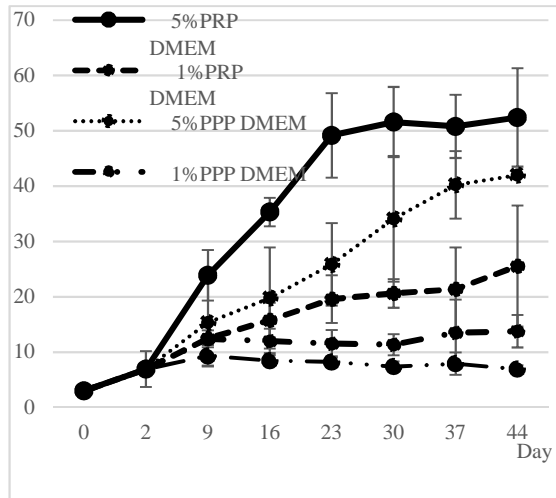


図 3 PRP と乏血小板血漿 (PPP) 添加時の hiPC の増殖能

(3) PRP/F 移植のための顎裂欠損マウスにおける条件の最適化

in vivo では超重症免疫不全マウス (NOD/Shi-scid, IL-2RyKO Jic: NOG マウス) の顎裂部が小さく移植には適さないことが明らかとなったため、マウスよりも大きく移植に適することが期待される T 細胞機能欠如ラット (F344/NJcl-rnu/rnu: ノードラット) を用いることになった。ノードラットの顎裂部に骨欠損を作製することができた。

(4) 顎裂欠損ノードラットへの PRP 移植

マウスから変更されたノードラットの骨欠損部へ PRP の移植を行うことに成功した。かつ移植直後にマイクロ CT 撮影を行い、骨欠損部の状態を確認することができた。今後は骨欠損部の組織学的検討を行う予定である (図 5)。

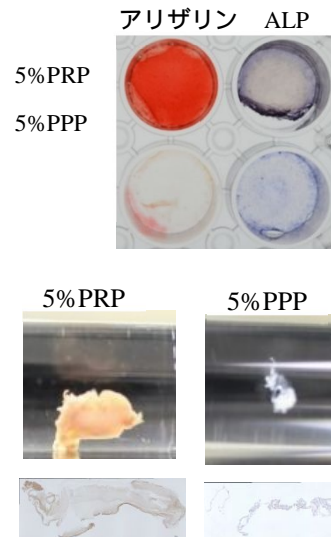


図 4 上: PRP と PPP 添加時の hiPC の骨への分化能 PRP 添加でアリザリン染色陽性であった 下: I 型コラーゲン染色 PRP 添加で I 型コラーゲン染色陽性であった



図 5 左: ノードラットの顎裂部 中央: 顎裂部に骨欠損を作製 右: 移植直後のマイクロ CT 画像

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kobayashi Shinji, Hirakawa Takashi, Sasaki Yasunari, Fukawa Toshihiko, Maegawa Jiro	4. 巻 72
2. 論文標題 Orthodontic premaxillary setback versus premaxillary osteotomy with gingivoperiosteoplasty for Bilateral cleft lip and palate patients: 4-year observation outcomes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery	6. 最初と最後の頁 1813~1818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjps.2019.05.047	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi S, Yasumura K, Hirakawa T, Fukawa T, Maegawa J	4. 巻 57
2. 論文標題 Evaluation of Congenital Maxillary Growth Using Computed Tomography in Patients With Bilateral Cleft Lip and Palate.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cleft Palate Craniofac J.	6. 最初と最後の頁 282-287.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1055665619874979.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 小林真司、平川 崇、府川俊彦	4. 巻 61
2. 論文標題 両側例における歯肉骨膜形成術後の顎裂部骨移植	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 形成外科	6. 最初と最後の頁 859-869
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi S, Hirakawa T, Fukawa T, Satake T, Maegawa J.	4. 巻 7
2. 論文標題 Synchronous Premaxillary Osteotomy with Primary Cheiloplasty for BCLP Patients with Protrusion of the Premaxillae.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plast Reconstr Surg Glob Open.	6. 最初と最後の頁 e1402
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/GOX.0000000000001402. eCollection 2017.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Shinji Kobayashi, Yukie Ohashi, Ryouko Fukushim, Takashi Hirakaw, Toshihiko Fukawa, Toshihiko Satake, Jiro Maegawa	4. 巻 7
2. 論文標題 Treatment of congenital short palate using bilateral buccal musculomucosal flaps.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Case report in plastic surgery and hand surgery.	6. 最初と最後の頁 57-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23320885.2020.1756821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計14件(うち招待講演 4件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Shinji Kobayashi
2. 発表標題 One cleft surgery in Yokohama
3. 学会等名 The 1st International Webinar for One step Unilateral Cleft Lip and Palate Surgery Leading to Pure Primary Healing (招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinji Kobayashi
2. 発表標題 Masters Round Table Discussion on Cleft Palate Surgery & Sequelae: Late Presentation, Prevention & Management of Fistulae
3. 学会等名 The 3rd INTERNATIONAL COMPREHENSIVE CLEFT CARE WORKSHOP (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林眞司、矢吹 雄一郎、安村 和則、福井 厚子、新保 裕子、田中 祐吉、大河内千鶴子、前川 二郎、城 潤一郎、田畑 泰彦
2. 発表標題 シンポジウム 乳児多血小板血漿の骨形成に対する促進作用
3. 学会等名 第29回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林眞司
2. 発表標題 シンポジウム 長期成績からみた唇裂初回手術の工夫点
3. 学会等名 第63回日本形成外科学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林眞司、矢吹 雄一郎、安村 和則、福井 厚子、新保 裕子、田中 祐吉、前川 二郎、城 潤一郎、田畑 泰彦
2. 発表標題 口唇口蓋裂に対する乳児多血小板血漿/フィブリンの骨形成に対する 促進作用
3. 学会等名 第12回多血小板血漿(PRP)療法研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林眞司、安村和則、金崎茉耶、佐々木愛、平川 崇、府川俊彦
2. 発表標題 術前顎矯正治療に依存した唇顎口蓋裂の初回手術
3. 学会等名 第62回日本形成外科学会総会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林眞司、安村和則、金崎茉耶、平川崇、府川俊彦、佐々木康成
2. 発表標題 シンポジウム：突出した中間顎を持つ両側例に対するNAM使用時の注意点
3. 学会等名 第43回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 S Kobayashi
2. 発表標題 Our treatment strategy with nasoalveolar molding, gingivoperiosteoplasty and Furlow palatoplasty for complete cleft lip and palate patients.
3. 学会等名 National Training Program in Cleft & Craniofacial Orthodontics. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 S Kobayashi
2. 発表標題 One stage operation using for cleft lip and palate patients
3. 学会等名 18th Annual Conference of Indian Society of Cleft Lip Palate and Craniofacial Anomalies. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林眞司、安村和則、平川崇、佐々木康成、成瀬正啓、府川俊彦、前川二郎
2. 発表標題 理想的な術前顎矯正治療と顎裂手術を目指して
3. 学会等名 第42回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小林 眞司、矢吹雄一郎、安村 和則、福井 厚子、田中 祐吉、新保 裕子、前川 二郎
2. 発表標題 乳児自家多血小板血漿の骨形成に対する促進作用
3. 学会等名 第10回多血小板血漿 (PRP) 療法研究会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 Kobayashi S
2. 発表標題 State-of-the-art Lecture: Current state of care for cleft lip and palate in Yokohama, Japan
3. 学会等名 The 32nd Swiss Society of Oral and Maxillo-facial Surgery (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林眞司
2. 発表標題 シンポジウム：骨移植前後の治療計画と手術デザイン
3. 学会等名 第41回日本口蓋裂学会総会・学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 小林眞司
2. 発表標題 ミニシンポジウム：口蓋裂術後長期言語成績と追加治療
3. 学会等名 第60回日本形成外科学会総会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林眞司	4. 発行年 2020年
2. 出版社 克誠堂出版	5. 総ページ数 266 p112-113
3. 書名 形成外科治療手技全書 先天異常	

〔産業財産権〕

〔その他〕

【English】What are Cleft Lips and a Cleft Palates?  
<http://kcmc.kanagawa-pho.jp/department/cleftlips-en.html>  
口唇口蓋裂とは？出生前診断から治療まで Medical Note掲載記事  
<https://medicalnote.jp/contents/180410-002-PS>  
神奈川県立子ども医療センター形成外科 ホームページ  
<http://kcmc.kanagawa-pho.jp/department/plastic.html>  
神奈川県立子ども医療センター 形成外科  
<http://kcmc.kanagawa-pho.jp/department/plastic.html>  
神奈川県立子ども医療センター 形成外科  
<http://www.kodomo-keiseigeka.kanagawa.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田中 祐吉  (Tanaka Yukiichi)  (50420691)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立子ども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・臨床研究所長   (82729)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------