

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：34408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17160

研究課題名(和文)新規ダブルアクチベート法を用いた多血小板血漿による歯槽骨再生法の開発

研究課題名(英文)Development of alveolar bone regeneration with platelet-rich plasma using a novel double-activation method

研究代表者

原 朋也 (Hara, Tomoya)

大阪歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60782092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：多血小板血漿Platelet-Rich Plasma(PRP)は自己の血液から調整される増殖因子を多量に含んだ血漿で骨再生、創傷治癒を促進させる効果がある。一方でPRPの効果は限定的で臨床的に安定しないという報告もある。その原因はPRP中の増殖因子量が少ないことによるものであると考え、新規ダブルアクチベート法を考案した。本法は既存のPRP調整法で調整済みのPRPに対して、電解機能水を加えることでPRP中の増殖因子量を増加させる方法である。本研究は新規ダブルアクチベート法による増殖因子量の変化を分子生物学的に評価することにより、PRPの作用を増強させ迅速かつ確実な歯槽骨再生を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、骨欠損に対して骨再生誘導法等で骨再生を試みインプラント治療を行っているが決定的な方法とは言い難い。そのため、画期的な骨再生治療を開発し迅速かつ確実な歯槽骨再生を可能にすれば、高齢化社会の質的向上へ大きく寄与できる。PRPは自己全血から調整されるもので骨再生、創傷治癒促進効果等を期待されすでに臨床応用されている。この効果は血小板内の増殖因子より起こる。しかし、多血小板血漿による骨再生効果は安定しないという問題が依然として残っている。今回、PRPの増殖因子量を増加させる方法として新規ダブルアクチベート法を考案した。このことにより、迅速かつ確実な歯槽骨再生が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Platelet-rich plasma (PRP) is a plasma containing a large amount of growth factors regulated from autologous blood and is effective in promoting bone regeneration and wound healing. On the other hand, there have been reports that the effects of PRP are limited and clinically unstable. We believe that this is due to the low amount of growth factors in PRP and have devised a novel double-activation method. This method increases the amount of growth factors in PRP by adding electrolyzed water to the PRP that has already been adjusted by the existing PRP adjustment method. This study aims to enhance the effect of PRP and to achieve rapid and reliable alveolar bone regeneration by molecular biological evaluation of the change in the amount of growth factors by the novel double-activation method.

研究分野：口腔インプラント学

キーワード：多血小板血漿 PRP Platelet-Rich Plasma 歯槽骨再生 電解機能水 次亜塩素酸水 酸性電解水

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

高齢者社会を迎え現在我が国における歯周病等による歯牙喪失による欠損状態は55歳以上で70%以上といわれている（厚生労働省医政局歯科保険課：平成28年歯科疾患実態調査）。しかし、義歯の違和感による欠損放置によるQOL低下が起こっている。また歯科インプラント治療を行う際にも骨欠損が大きく治療対象とならないことも多い。近年、骨欠損に対してbFGFなどを用いた骨再生誘導法等で骨再生を試みインプラント治療を行っているが決定的な方法とは言い難い。従って、画期的な骨再生治療を開発し迅速かつ確実な歯槽骨再生を可能にすれば、高齢者社会の質的向上へ大きく寄与できる。多血小板血漿(Platelet-Rich Plasma:PRP)は自己全血から調整される安全なもので我が国を含め世界中の歯科、整形外科、形成外科領域等で骨再生、創傷治癒促進効果等を期待されすでに臨床応用されている。この効果は多血小板血漿に含まれている血小板が活性化され血小板内の α 顆粒が多種多様な増殖因子が放出されることにより起こる。今までの研究で*in vitro*で幹細胞などの多種多様な細胞増殖効果が示されている。しかし、多血小板血漿調整方法により増殖因子量に大きな差があること、多血小板血漿による骨再生効果は安定しないという問題が依然として残っている。

2. 研究の目的

従来の多血小板血漿調整法で作成された多血小板血漿には増殖因子を放出していない状態の血小板(すなわち未活性の血小板)を多量に有している。そこですでに臨床に広く普及している多血小板血漿調整システムを変更せずに、血小板の活性化の割合を向上させ増殖因子量を増加させる方法として新規ダブルアクチベート法を考案した。本新規ダブルアクチベート法は食品の消毒等で用いられる安全な電解機能水生成器で作成された酸性の電解機能水を多血小板血漿に加えることにより未活性状態の血小板を活性化させ α 顆粒中の増殖因子を放出させる方法である。つまり多血小板血漿に電解機能水を加えるだけで多量の増殖因子を得ることができ、迅速かつ確実な歯槽骨再生が可能となる。本研究は多血小板血漿に電解機能水を用いるという新規ダブルアクチベート法で多血小板血漿の増殖因子量を増加させることにより、迅速かつ確実な歯槽骨再生方法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

新規ダブルアクチベート法による多血小板血漿を用いた迅速かつ確実な歯槽骨再生方法を実現するため下記の実験を計画した。

- (1) 電解機能水の性質の確認
- (2) 電解機能水の*in vitro*における細胞親和性評価
- (3) 多血小板血漿を電解機能水で活性化させる際の至適条件の探索
- (4) ダブルアクチベート法による多血小板血漿の*in vitro*での細胞親和性および骨芽細胞分化評価
- (5) ダブルアクチベート法による多血小板血漿の至適保存方法の探索
- (6) ラット頭蓋骨欠損モデルでのダブルアクチベート法による多血小板血漿での骨再生の確認
- (7) イヌ歯槽骨欠損モデルでのダブルアクチベート法による多血小板血漿での骨再生の確認
- (8) イヌ上顎洞を用いた上顎洞挙上術でのダブルアクチベート法による多血小板血漿での骨再生の確認

3-1：電解機能水の性質の確認

電解機能水は、E0-005（株式会社セルフメディカル）によって生成する。電解機能水と同時にアルカリ性生成水も生成される。両方のpH測定、保存条件によるpH変化についてpH計（アイスフエトコム株式会社）を用いて測定を行う。

3-2：電解機能水の*in vitro*における細胞親和性評価

24時間無血清環境下において、骨髄由来間葉系細胞株のD1細胞に対して生成24時間後の電解機能水を各種濃度で滴下し、WST-8（株式会社同仁化学研究所）による細胞増殖度の測定、live/dead染色（LIVE/DEADTM Viability/Cytotoxicity Kit）による細胞毒性の確認を行う。

3-3：多血小板血漿を電解機能水で活性化させる際の至適条件の探索

調整した多血小板血漿に対して、通法による血清および塩化カルシウムによる活性化方法、電解機能水によるダブルアクチベート法による活性化方法で活性化を行い、各種増殖因子量の変化をEnzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（R&D Systems, Inc.）を用いて測定する。

3-4: ダブルアクチベート法による多血小板血漿の in vitro での細胞親和性および骨芽細胞分化評価

通法の血清および塩化カルシウムを用いて活性化した多血小板血漿を 24 時間無血清化 D1 細胞に滴下し、WST-8 による細胞増殖度の測定、live/dead 染色による確認を行う。

3-5: ダブルアクチベート法による多血小板血漿の至適保存方法の探索

保存条件により通法およびダブルアクチベート法による各種増殖因子量の変化を測定する。

3-6: ラット頭蓋骨骨欠損モデルでのダブルアクチベート法による多血小板血漿での骨再生の確認

12 週齢ラット頭蓋骨にトレフィンバーにて臨界骨欠損を作成し同部にコラーゲンスポンジ単独群、通法にて活性化した多血小板血漿を滴下したコラーゲンスポンジ群、ダブルアクチベート法による活性化を行った多血小板血漿を滴下したコラーゲンスポンジ群を設定し埋入する。埋入後 4・8・12 週後にサンプリングを行い μ CT にて X 線学的評価、DXA にて骨密度測定を行った後、ヘマトキシリンエオジン染色ならびにトルイジンブルー染色を行い、新生骨の観察を行う。

3-7: イヌ歯槽骨欠損モデルでのダブルアクチベート法による多血小板血漿での骨再生の確認

3-8: イヌ上顎洞を用いた上顎洞挙上術でのダブルアクチベート法による多血小板血漿での骨再生の確認

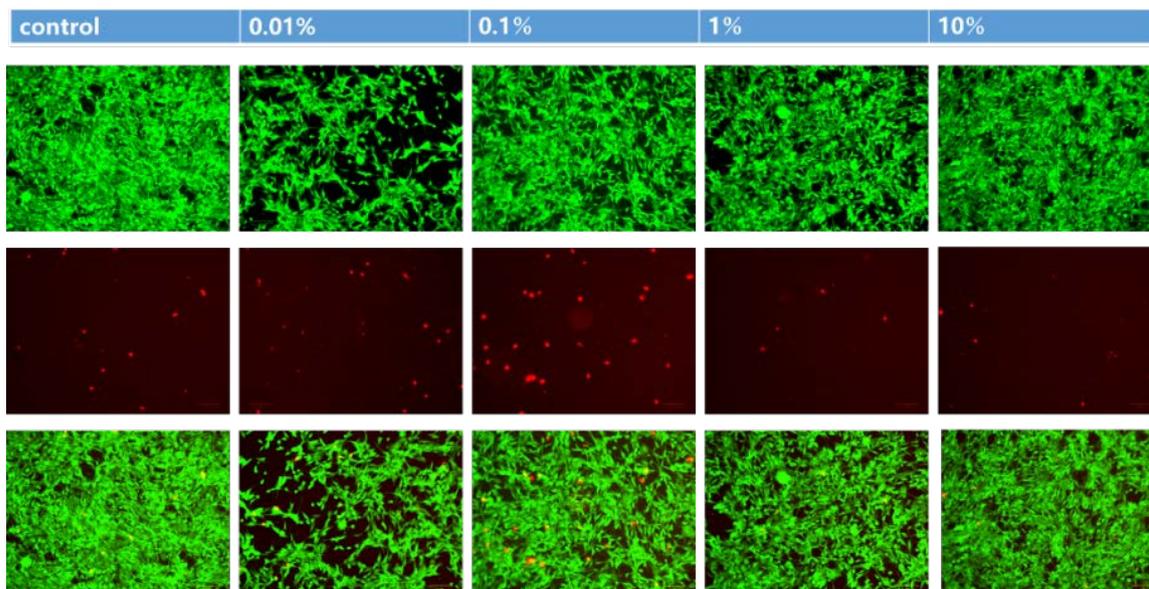
イヌ下顎骨臼歯部を抜歯し、骨再生誘導法を想定した頬側骨欠損を作成する。また同時に上顎洞に対して歯槽骨側方から骨窓を作成し、同部からアプローチして上顎洞粘膜を挙上する。共に通法にて活性化した多血小板血漿を滴下したコラーゲンスポンジ群、ダブルアクチベート法による活性化を行った多血小板血漿を滴下したコラーゲンスポンジ群を設定し埋入する。埋入後 12 週後にサンプリングを行い μ CT にて X 線学的評価、DXA にて骨密度測定を行った後、ヘマトキシリンエオジン染色ならびにトルイジンブルー染色を行い、新生骨の観察を行う。

4. 研究成果

4-1: 電解機能水の性質の確認

生成した電解機能水の pH 変化は、細胞培養用培地の pH 挙動に影響を及ぼし、細胞機能および細胞活性へ影響を与える。電解機能水の pH は生成後時間経過と共に、中性に近づいていくが、生成 4 週後の電解機能水の pH は依然 3.3 であった。一方、電解機能水生成時に同時に生成されるアルカリ性生成水の pH は 10.9 であった。

4-2: 電解機能水の in vitro における細胞親和性評価

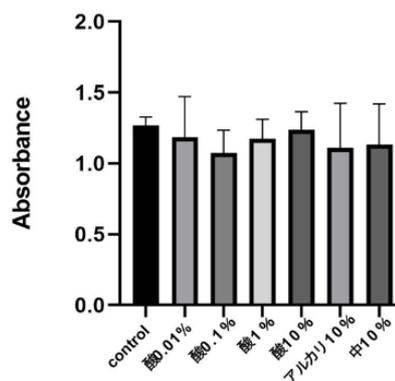


電解機能水の細胞毒性評価。上段：Live cell、中段、Dead cell、下段：Merge。Control：増殖培地 (DMEM+10%ウシ胎児血清+抗生物質)、0.01%：DMEM に 0.01%の電解機能水を追加。0.1%：DMEM に 0.1%の電解機能水を追加。1%：DMEM に 1%の電解機能水を追加。10%：DMEM に 10%の電解機能水を追加。細胞：D1 細胞。

ダブルアクチベート法による多血小板血漿活性化方法の基礎的知見となる D1 細胞の電解機能水

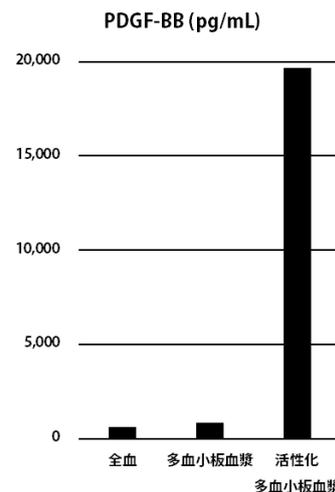
による影響を調べた。その結果、電解機能水が酸性にもかかわらず基礎培地に対して 0.01%、0.1%、1%、10%どの群においても live/dead 染色で細胞死を認めなかった(前頁図)。

また、WST-8 による細胞増殖度の測定においても、基礎培地に対して 0.01%、0.1%、1%、10%どの群においても増殖度に影響はなく、悪影響を及ぼさなかった(右図)。また、電解機能水と同時に生成されるアルカリ性生成水は同様に 10%で細胞毒性は認められなかった。



4-3: 多血小板血漿を電解機能水で活性化させる際の至適条件の探索

電解機能水によるダブルアクチベート法による活性化条件の模索の前に全血から適切に多血小板血漿が調整出来ているか確認するために通法の血清および塩化カルシウムによる活性化によって PDGF-BB が適切に放出されているか確認するために濃度を測定した。その結果、全血 629pg/mL に対して活性化後の多血小板血漿は約 31 倍の 19692pg/mL 高値を示した。通法による多血小板血漿の調整および活性化が問題なく出来ていることを確認した(右下図)。



これらの結果より、本研究の基盤となる電解機能水は骨髓由来間葉系細胞株の D1 細胞に対して、10%濃度においても、顕著な細胞毒性を示さなかった。また、同時に生成されるアルカリ性生成水に対しても 10%で細胞増殖に悪影響を及ぼさなかった。同知見は、電解機能水及びアルカリ性生成水が基礎培地の緩衝効果で pH が中性になったためと予想される。従って、ダブルアクチベート法による多血小板血漿の活性化の際に用いる電解機能水は中性化され細胞毒性を示さない可能性を示す。本研究期間では、当初予定していた電解機能水で活性化された多血小板血漿を用いた細胞分化実験および動物実験には着手できていない。しかし、本研究で確認した電解機能水および同時に生成されるアルカリ性生成水の細胞親和性評価は、電解機能水の歯槽骨再生への応用の基礎知見となると予想され、今後も電解機能水を用いた歯槽骨再生に関する詳細な検討を進める予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------