

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17162

研究課題名（和文）完全自己血フィブリン糊の上皮形成能を応用した創部処理法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a Wound Treatment Method Applying the Epithelialization Ability of Completely Autologous Fibrin Glue

研究代表者

額 衆（Koketsu, Atsumu）

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：20806335

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：臨床試用では期待されていた自己血フィブリン糊の安全性、簡便性などのほか、疼痛や癬痕形成軽減および創部治癒促進などの効果も認められ、自己血フィブリン糊の優れた上皮形成能を示唆する成果であった。自己フィブリン糊の上皮形成能について上皮欠損マウスモデルを用いて評価した。上皮形成能をHE染色および免疫染色にて評価した。免疫組織学的には、Laminin, VEGF, Cytokeratinにて上皮形成および血管新生が確認できた。またMacro評価では上皮の迅速な再生が認められ、自己血フィブリン糊による創部処理は、上皮形成能に優れ、創傷治癒効果を期待できる結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実績のある自己血輸血療法は、医療費の観点および安全性の面から、国内外で改めて注目されている。自己血由来の濃厚赤血球と新鮮凍結血漿を副産物で得られ、さらに汎用性の高いフィブリン糊が得られる本法については、大きな役割を持っているとされる。現在、当分野が先駆けて、臨床展開が盛んであるが、自己血貯血の機会が多く、フィブリン糊を外科手術で使用する、心臓血管外科、婦人科、脳神経外科、耳鼻科、整形外科、消化器外科、呼吸器外科などでの臨床応用や臨床研究が始まっている。

本研究は自己血フィブリン糊の新たな使用展開を示すことができ、重要な意味を持つと考える。

研究成果の概要（英文）：Clinical trials showed that autologous fibrin glue was not only safe and easy to use, as expected, but also reduced pain and scar formation, and promoted wound healing, suggesting the superior epithelial-forming ability of autologous fibrin glue. The epithelial forming ability of autologous fibrin glue was evaluated using an epithelial-deficient mouse model. The epithelial forming ability was evaluated by HE staining and immunostaining. Immunohistochemically, epithelial formation and angiogenesis were confirmed by Laminin, VEGF, and Cytokeratin. Grossly, rapid epithelial regeneration was observed, indicating that wound treatment with autologous fibrin glue has excellent epithelial formation and wound healing effects.

研究分野：歯学

キーワード：自己フィブリン糊

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの口腔外科手術における軟組織欠損部の創部処理方法の特徴

- ・植皮術ではドナー側での侵襲が、縫縮術は運動障害や審美障害などの欠点があった。
- ・これまでの人工材料はあくまで一時的な欠損への被覆・補填のみ。上皮形成を促さない。

(2) 吸収性ポリグリコール酸シートと同種血フィブリン糊による創部処理

この創部処理は簡便性および安定性に優れ、その有用性を私たちは報告した(文献 1)。微生物や摂食、発語、呼吸などの外的刺激にさらされる口腔内において、本法は適しており優れた臨床成績を示した。現在、国内外の施設において広く用いられるようになった。

(3) 用手法による自己血フィブリン糊の応用

前述の同種血フィブリン糊はプールされたヒト血液由来であった。そのため、感染症やアレルギーのリスクが皆無ではなく、高価であった。私たちは自己血漿から用手的に自己血フィブリン糊を生成する方法に着目し、口腔外科手術に応用した。

(4) 自動機器による完全自己血フィブリン糊による創部処理の確立

前述の用手法による自己血フィブリン糊のトロンビン成分はウシ血液由来であった。自動機器により生成されたフィブリン糊は完全自己血由来の生体材料であり、私たちはこの材料を用いた創部処理法を確立した。完全自己血フィブリン糊は多くの血漿成分(VIII 因子, XIII 因子, γ VF, フィブロネクチン, TGF- β , VEGF)を含む。そのため、より強い器械的性質を持ち、創傷治癒効果や局所感染予防効果が確認できた。「その効能は、血漿成分により誘導される優れた上皮形成能によるものではないか?」と、私たちは考えた。

2. 研究の目的

私たちの研究では、自己血フィブリン糊の上皮形成メカニズムを明らかにするために、また今後の更なる使用展開のために、以下の 3 つの研究目的を掲げた。

(1) 粘膜欠損部における自己血フィブリン糊による処理後の上皮の免疫組織学的評価:私たちは臨床的な知見から自己血フィブリン糊の口腔粘膜形成能を評価した。また予備実験において背部上皮欠損ラットに対する効果も確認できた(後述)。その旺盛な上皮形成能について、口腔粘膜欠損ラットを用い、免疫組織学的に評価する。

(2) 骨露出面における自己血フィブリン糊による処理後の上皮形成能の評価:これまで自己血フィブリン糊は軟組織単独もしくは骨単独に対して使用されてきた。口腔の腫瘍切除後や骨髄炎などの慢性炎症性疾患における骨露出面では、粘膜形成が治療成績に関わることが大きい。骨露出・上皮欠損モデルラットを用い、骨露出面での自己血フィブリン糊の被覆処理後の上皮形成能の評価をする。

(3) 新規骨補填材料と自己血フィブリン糊による処理後の上皮形成能および骨形成能の評価:当領域では、骨補填材料の開発および使用が盛んに行われている。その中でもリン酸オクタカルシウム・コラーゲン複合体(以下、OCP/Collagen)は歯科領域における使用展開が強く期待されている材料である。骨補填材の適応には良好な上皮形成が必要不可欠である。骨補填材上での上皮形成を生体材料で行うことが出来れば、口腔再建の臨床適応は大きく拡大する。そこで上皮および骨欠損ラットを用い、骨補填材料と自己血フィブリン糊の組み合わせによる処理後の上皮形成能および骨形成能の評価を行う。

3. 研究の方法

本研究では以下の通り、自己血フィブリンによる創部処理の上皮形成能評価を行う。また当大学輸血細胞治療部、医工学研究分野および口腔病理学分野の研究分担者による協力をいただく。

(1) 自動機器(クリオシールシステム)による完全自己血フィブリン糊の生成

当大学輸血細胞治療部の協力のもと、自己血フィブリン糊の生成に関してはクリオシールシステム®を使用する。貯血した血漿からクリオプレシピテートとトロンビン液を滅菌閉鎖回路内で自動的に調製する。抽出が難しいとされるトロンビン調整に関しては、陰性荷電刺激ビーズを用い抽出する。

(2) 粘膜欠損ラットを用いた、自己血フィブリン糊の処理後上皮の免疫組織学的評価。

上皮形成能は免疫組織学的に評価する。予備実験での背部表皮欠損マウスで上皮形成能は確認できているため(後述)、同様の手法を用いる。

ラットの口蓋に 5×5mm の粘膜欠損を作る．粘膜欠損部に吸収性ポリグリコール酸シートおよびクリオシールにて作成した自己血フィブリン糊を被覆する．コントロールにはウシ真皮コラーゲンシートを被覆する．処置術後 1 週，2 週，4 週，8 週の各々の粘膜形成能を，HE 染色および免疫染色(CD31・RAM-11・フィブロンectin・ α -SMA)にて評価する．

(3) 骨露出・皮膚欠損ラットを用いた，自己血フィブリン糊の処理後の上皮形成能の評価．

予備実験で作成している頭蓋骨露出・上皮欠損ラットを用いる．上皮欠損部で骨露出面に吸収性ポリグリコール酸シートおよびクリオシールシステムにて作成した自己血フィブリン糊にて被覆する．上皮形成能を HE 染色および (1)と同様の免疫染色にて評価する．

(4) 骨補填材料と自己血フィブリン糊による処理後の上皮形成能および骨形成能の評価．

予備実験で作成した頭蓋骨欠損部に新規骨補填材料 OCP/Collagen を填入し，上皮欠損処理を施したラットを用いる．OCP/Collagen 直上の上皮欠損部に吸収性ポリグリコール酸シートおよびクリオシールシステムにて作成した自己血フィブリン糊にて被覆する．上皮形成能および骨形成能を HE 染色およびエラスチカ・マッソン染色，免疫染色(オステオポンチン・オスオカルシン・TRAP・RANX2・1 型コラーゲン・アルカリフォスファターゼ)にて評価する．

4．研究成果

当大学輸血細胞治療部の協力のもと，完全自己血フィブリン糊生成および使用に関しては，先行研究にて確立した方法で精製した．貯血した血漿からクリオプレシピテートとトロンビン液を滅菌閉鎖回路内で自動的に調製した．

臨床試用では期待されていた自己血フィブリン糊の安全性，簡便性などのほか，疼痛や瘢痕形成軽減および創部治癒促進などの効果も認められ，自己血フィブリン糊の優れた上皮形成能を示唆する成果であった．自己フィブリン糊の上皮形成能について上皮欠損マウスモデルを用いて評価した．上皮形成能を HE 染色および免疫染色にて評価した．免疫組織学的には，Laminin, VEGF, Cytokeratin にて上皮形成および血管新生が確認できた．また Macro 評価では上皮の迅速な再生が認められ，自己血フィブリン糊による創部処理は，上皮形成能に優れ，創傷治癒効果を期待できる結果となった．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kouketsu Atsumu, Matsui Keiko, Kawai Tadashi, Ezoe Yushi, Yanagisawa Toshiki, Yasuda Ayato, Takahashi Tetsu, Kamakura Shinji	4. 巻 14
2. 論文標題 Octacalcium phosphate collagen composite stimulates the expression and activity of osteogenic factors to promote bone regeneration	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine	6. 最初と最後の頁 99 ~ 107
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/term.2969	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 Kouketsu Atsumu, Shimizu Yoshinaka, Nogami Shinnosuke, Yamada-Fujiwara Minami, Nagai Hirokazu, Yamauchi Kensuke, Miyashita Hitoshi, Saito Haruka, Odashima Kenji, Yanagisawa Yuta, Takahashi Tetsu	4. 巻 なし
2. 論文標題 Wound healing effect of autologous fibrin glue and polyglycolic acid sheets in a rat back skin defect model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Transfusion and Apheresis Science	6. 最初と最後の頁 103144 ~ 103144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.transci.2021.103144	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Atsumu Kouketsu, Yoshinaka Shimizu, Shinnosuke Nogami, Shiro Mori, Kensuke Yamauchi, Hitoshi Miyashita, Tadashi Kawai, Yoshiyuki Kumamoto, Tetsu Takahashi
2. 発表標題 Clinical and basic evaluations of complete autologous fibrin glue, produced by the CryoSeal® FS System as wound coverings after surgery
3. 学会等名 13th Asian Congress of Oral and Maxillofacial Surgery (ACOMS) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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
---------	---------