

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17201

研究課題名（和文）凍結乾燥多血小板血漿から血小板溶解液 - フィブリン複合体への展開

研究課題名（英文）Expansion of freeze-dried platelet rich plasma into platelet lysate with fibrin

研究代表者

中谷 佑哉（NAKATANI, Yuya）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員

研究者番号：50770822

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）：本研究では、血小板溶解液 - フィブリン複合体(PLF)を用いた組織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た。PLFはPRPから白血球分画を除去したもので、PRPと比較してより高い組織再生作用が期待できる。本研究ではPLFの調製法の検討、PRPとPLFの性状比較、ヌードマウス頭蓋骨膜下移植モデルを用いた動物実験でPLFおよびFD-PLFの骨再生能を検討した。結果として、本研究で調製したPLFは、一部の検体においてはPRPが示すような有効性を確認できたものがあったが、ドナー間の個体差が大きく明確な結果は得られなかった。そのため、現在もPLFの調製条件等を含め、より詳細に検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来のPRP調製法の問題の一つが、一定量のPRPを必要とする場合、大量採血が必要となり、患者の負担が大きくなる場合が多いことであった。そこで、血液製剤のように同種他家のPRPを調製、利用できれば、患者負担も軽減すると考えられた。また、除去フィルターで白血球を除去することで、PLFの生理活性を維持した状態で、PLFの同種他家移植も可能になると考えられたが、本研究の結果からはPLFの調製法のさらなる検討が必要であることが示唆された。

今後、PLFの調製技術を確立できれば、患者への侵襲や負担も軽減でき、PLFの同種移植での応用が拡大することで、より多くの患者が再生医療の恩恵に浴することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop the new method for tissue regeneration by Platelet Lysate with Fibrin (PLF), and to investigate its efficacy.

PLF is prepared by removing leucocytes from Platelet Rich Plasma (PRP), and PLF has higher potential for tissue regeneration than that of PRP. We evaluated PLF preparation method and compared property of PLF with that of PRP, and then demonstrated capability of bone regeneration of PLF and Freeze-Dried PLF (FD-PLF) by onlay-grafted onto mice calvaria model.

As the result, partial PLFs in this study, which is prepared from some of donors, have availability such as that of PRP. However, we could not prove defined result about efficacy of PLF because there was considerable individual variability among donors. Therefore, we have kept on investigating PLF in more detail, including procedure of it.

研究分野：骨再生医科学

キーワード：血小板溶解液 - フィブリン複合体 骨再生

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

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、血小板由来成長因子 (PDGF)、トランスフォーミング成長因子 β (TGF- β)、血管内皮細胞成長因子 (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知られている。

多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma: 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ってきた。

しかし、次に挙げる事項が障害となり、歯科医院での PRP 臨床応用の普及を妨げている。

すなわち、

- (1) PRP 調製には採血が不可欠で、採血の技術的習熟が必要である。
- (2) PRP 調製には遠心分離機が必要であり設備投資が必要である。
- (3) PRP は用事調製が必要であり、術中の調製のタイミングが図りづらく、人員の確保が必要である。
- (4) さらに、再生医療新法での第 3 種再生医療の適応により、再生医療等委員会での審議を経た厚生省の認可が必要であり、複雑な事務手続きを要する。

といったものである。

そこでわれわれは PRP を凍結乾燥して用いることを考案した。

すなわち、特定の病院等施設で、患者の都合の良いときに採血を行い、これを冷蔵保存することによって、いつでも使用することが可能になる。さらに細胞成分は破壊されているので、再生医療製品の適応を受けない。

そこでわれわれは先行研究において、凍結乾燥多血小板血漿 (Freeze Dried PRP: FD-PRP) による骨再生の有用性の検討を行った。その結果、PRP に凍結乾燥処理を施しても、成長因子およびフィブリンネットワークは機能的損失なく保存できることが示され、再構成時の加水量を減じることで、PRP を濃縮することが可能となり、骨再生能をより高めることも可能であることを明らかにした (Nakatani et al., *Arch Oral Biol* 2017)。

また、この加工技術には、PRP を使用したいタイミングで加水するのみで即時利用できるという簡便性や、PRP 療法を導入していなかった歯科医院から病院口腔外科への FD-PRP 調製依頼システムを構築することにより、PRP の臨床応用機会を拡大できるという利点がある。

今回われわれはこの FD-PRP を、より高機能でより利便性の高いものにするのを企画した。すなわち、先行研究において、PRP を調製する際は、全血の遠心分離後にバフィーコートと呼ばれる血小板と白血球を含んだ分画とその直上の血漿を含めて抽出を行ったが、白血球にはプロテアーゼが含まれており、これによって血小板活性が低下し、組織再生を妨げるという報告から (Bergmeier et al., *Blood* 2003; Bender et al., *Blood* 2010)、白血球を除去することで、PRP の生理活性をより高めることができるのではないかと考えた。

また、PRP の採取量が通常は採血量の 1/10 となるため、一定量の PRP を必要とする場合は、大量の採血が必要となり、患者の負担が大きくなる場合が多く、血液製剤のように同種他家の PRP を調製、利用できれば、患者負担も軽減すると考えられる。

その際、免疫反応など抗原性の面で問題となる MHC クラス II 分子は白血球中の抗原提示細胞に局在していることから、PRP 中の白血球を除去することで、この問題も解決できると考えた。

そこで、われわれは PRP 中に含まれる白血球をフィルターによって除去し、血小板を溶解して得られた分画である血小板溶解液 (Platelet Lysate: PL) に着目した。

PRP に対して凍結、溶解のサイクルを加えると、血小板が破壊され、内部の α 顆粒から前述した多くの成長因子が放出されることで、高い生理活性を有した状態となる (Altaie et al., *World J Stem Cells* 2016)。この性質から、幹細胞培養時のウシ胎児血清 (FBS) の代替物として用いる研究も行われており、その有用性が多く報告されている (Lange et al., *J Cell Physiol* 2007; Shih et al., *N Biotechnol* 2015 など)。

しかし、PL そのものに対して組織再生、特に骨再生誘導治療薬としての検討、および同種移植に関する検討はほとんどなされていない。また、PL は調製時にフィブリンが除去されるため、フィブリンを含有した PL に関する検討もなされていない。

そこで、われわれは既に製品化され輸血用製剤作成の際に用いられている除去フィルターを用い、事前に白血球を除去することで、上記のとおり PL の生理活性を維持することができ、PL の同種他家移植も可能になると考え、本研究での検討を企画した。

将来的には、輸血用血液を用いて大量調製した PL を使用することで、患者への侵襲や負担も軽減することも可能となる。

加えて、われわれが確立した凍結乾燥を用いた PRP 保存法を応用すれば、これまで PRP を導入していなかった歯科医師に対しても PL による組織再生治療を提供可能となる。また、フィブリンを含有した PL を開発することにより、より組織再生能を高めることができると考えられた。

2. 研究の目的

本研究は、血小板溶解液-フィブリン複合体(Platelet Lysate with Fibrin: PLF)を用いた同種移植による組織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、PRP 中に含まれる白血球を除去し、血小板を溶解して得られた分画である PL とフィブリン複合体の組織再生作用について検討を行った。また、先行研究で開発した技術を応用して、PLF を凍結乾燥処理した FD-PLF に関しても同様に検討を行った。

3. 研究の方法

(1)白血球除去法の検討

第一に、本研究の核心である白血球の除去法に関し、既に広く用いられている白血球除去フィルターを用いて PRP から白血球を除去して PLF を調製し、血球測定器にて白血球の残存の有無を確認した。

(2)電子顕微鏡による PLF のフィブリンネットワークの観察

PRP の重要な構成要素のひとつとしてフィブリンがあり、PRP が活性化することにより、フィブリンのネットワークが三次元的な網目構造を形成する。この構造物は細胞の足場となり、また、成長因子の局所保持に働き、長時間効果を発揮させる役割もある。PLF 調製の過程で、PRP を冷凍、溶解する操作が加わるため、フィブリンおよびそのネットワークにどのような影響が現れるかを電子顕微鏡で観察し、PRP のものと比較検討を行った。

まず、PRP から白血球を除去した分画(PRP' とする)と PRP を電顕顕微鏡で比較観察を行い、ついで PRP' に対して冷凍、溶解サイクルを加えて PLF とした状態で再確認を行った。

PLF を凍結乾燥処理した FD-PLF に関しても同様に観察を行った。フィブリン観察時は滅菌水による加水還元後に確認した。

フィブリンネットワークの観察に関しては、PRP、PRP'、PLF、FD-PLF をそれぞれ活性化して観察した。

(3)小動物実験での PLF の骨再生促進能の検討

先行研究で行ったヌードマウス頭蓋骨膜下移植モデルを用い、PLF の骨再生促進能の検討を行い、PRP と比較した。また PLF を凍結乾燥処理した FD-PLF でも同様の検討を行った。移植担体は PLF および FD-PLF を骨補填材である β -TCP と混和させて作製した。

評価法も先行研究と同様に、H-E 染色切片による組織解析法にて行った。

(4) PLF の骨芽細胞増殖能および分化誘導能の検討

PLF は PRP から白血球を除去することで、プロテアーゼによる活性阻害を抑制し、その生理的活性が維持できるとされている。そこで、PLF と PRP を培養ヒト間葉系幹細胞に作用させ、細胞増殖能および骨芽細胞等への分化誘導能の比較検討を行った。

(5) FD-PRF の保存期間の検討

FD-PLF がどれくらいの期間活性を維持できるか、異なる保存期間を設定した FD-PLF を用いて、ヌードマウス頭蓋骨膜下移植モデルでの移植実験を中心に検討した。

4. 研究成果

(1)白血球除去法の検討

白血球除去フィルターを使用して調製した PLF を血球測定器で検査したところ、白血球の残存は認められなかった。また、血小板数の減少は認められなかった。

今後は下記の背景から、調製法の検証の一つの方法として、HLA の残存を ELISA で評価することによって判定し、白血球の有無判定をより厳密化することとした。

(2)電子顕微鏡による PLF のフィブリンネットワークの観察

(3)小動物実験での PLF の骨再生促進能の検討

PRP'、PLF および FD-PLF のフィブリン、フィブリンネットワークの観察において、一部の検体試料では本研究の PLF 調製法に対する有効性が認められたが、検体の個体差が大きかった。

また、これらの検体試料を小動物実験に供したところ、フィブリンネットワーク保存に有効性が認められた一部の検体に関しても、骨再生促進能に個体差が認められた。

加えて、同一ドナーでも、両実験の結果に差が認められ、明確な結果が得られなかった。そのため、ドナー数も増やししながら、PLF の調製方法を含め、より詳細な検討を継続している。

今後、小動物実験においてはヒト PLF の同種移植を想定した免疫反応評価のため、通常免疫マウス頭蓋骨膜下移植モデルでの異種移植の動物実験も検討している。

(4) PLF の骨芽細胞増殖能および分化誘導能の検討

(5) FD-PRF の保存期間の検討

上記(2)、(3)と並行して、現在実験進行中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 NAKATANI Y
2. 発表標題 Efficacy of Freeze-Dried Platelet-Rich Plasma in bone engineering and its future prospects
3. 学会等名 69th Congress on German Association for Oral and Maxillofacial Surgery (国際学会)
4. 発表年 2019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
研究協力者	朝比奈 泉 (ASAHINA Izumi)		
研究協力者	住田 吉慶 (SUMITA Yoshinori)		
研究協力者	古賀 喬充 (KOGA Takamitsu)		