

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09857

研究課題名（和文）口唇口蓋裂に対する自己多血小板血漿を用いた顎裂骨形成法の開発

研究課題名（英文）Osteogenic potential of human infant platelet-rich plasma in vitro for alveolar cleft repair

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） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：唇顎口蓋裂の顎裂骨欠損部に対して自己多血小板血漿/フィブリン（PRP/F）を移植することにより骨形成を促進させるために、再生医療等安全性確保法下に「PRP/Fによる再生医療」を不具合なく安全に行っている。基礎実験ではT細胞機能欠如ラットの顎裂骨欠損モデルを作製し、顎裂部へPRPを新規ゼラチンハイドロゲルシート（GHS）に含有させて移植を行い、3D slicerを用いて術前後の骨体積を測定した。その結果、PRP+GHS群は骨形成において有意差がなかった。この原因は、ラットの顎裂部が小さいために操作が煩雑になったことがあげられ、今後症例数を増やし検討を重ねる予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生後6ヶ月頃に自己PRPを移植し、骨が形成されたという報告は世界的にもなく、画期的な治療法になり得る。しかし、基礎研究に関しては世界的にもPRP/Fに関するデータはほとんどなく、明らかなEBMは示されていない。本研究により、乳児のPRP/F中に含有する成分を詳細に解析し骨形成の機序を解明する技術を開発することはEBM確立のためにも必須であると思われる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to analyze the effect of PRP/F to the human infant periosteal cells (hiPCs) in patients with cleft lip and palate in vitro and to elucidate the mechanism of PRP /F in alveolar cleft reconstruction. A rat (F344/NJcl-rnu/rnu) model with cleft bone defect was created, and PRP was implanted in a novel gelatin hydrogel sheet (GHS) in the defect. Quantitative bone morphometry analyses were performed using a high-resolution microcomputed tomography. Three dimensional images were analyzed by 3D-slicer software. The results showed that the PRP+GHS group represented no advantage in bone formation compared to the other groups. It seemed that the small defect made the operation complicated. We plan to study more cases for further investigation.

研究分野：小児形成外科

キーワード：唇顎口蓋裂 多血小板血漿 骨形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯肉骨膜形成術(gingivoperiosteoplasty:GPP)は、口唇口蓋裂の顎裂部を閉鎖する手術である。この手術を生後5ヶ月前後に口唇形成術と同時に行うことで、顎裂部の骨が形成され、その後(6~10才)の顎裂部骨移植術(secondary bone graft:SBG)が必要なくなる。当科では、1999年に本邦で初めてGPPを行い、現在まで合併症なくほぼ全ての患者で骨形成が認められている。しかし、顎裂部の骨形成が十分でない症例もあり、SBGを必要としない症例は両側例で40%、片側例で60-65%程度である。

一方、多血小板血漿/フィブリン(platelet rich plasma/ fibrin:PRP/F)は1990年初め頃より臨床応用され、現在、歯科領域、美容外科、創傷治癒などで幅広く応用されている。PRP/F中に含まれる血小板は、複数の成長因子を放出し骨芽細胞の増殖、毛細血管の新生、骨造成および軟組織の治癒に促進的役割を果たすとの報告がある。1998年Marxらによる骨移植におけるPRPの骨形成促進能についての報告以来インプラント治療や歯槽骨再生治療などにPRP/Fの研究が行われているが、唇顎口蓋裂の顎裂部のような広範囲な部位に骨を形成させる研究は行われていない。

2. 研究の目的

唇顎口蓋裂患児に対する乳幼児期の歯肉粘骨膜形成術は、顎裂部に骨を形成させる手技である。しかし、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ために、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PRP/Fは、血小板の顆粒に含まれている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。臨床的には、平成26年11月25日より施行された「再生医療等の安全性の確保等に関する法律(平成25年法律第85号)」「再生医療等安全性確保法」下の第3種細胞群として「PRP/Fによる再生医療(計画番号PC3150413)」を行っており、全症例で安全に施行できている(図1)。



図1 PRP/F移植方法

PRPとPRF(左図)、顎裂部へ移植されたPRP(右図左)とPRF(右図右)

本研究は、in vivoにおいてT細胞機能欠如ラット(F344/NJcl-rnu/rnu:ヌードラット)の顎裂部へPRPの移植を行うとともに新規のゼラチンハイドロゲルシートに含有させて移植を行い、骨形成能の機序を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

PRP/F 中の液性因子および in vitro でのヒト乳児骨膜細胞(human infant periosteal cells:hiPC)の挙動を解析し骨形成の機序を解明し、臨床において自己 PRP/F を移植することで骨形成を促進させることである。

hiPC の骨分化能を組織学およびアリザリンレッド吸光度分析にて行った。吸光度分析は、96-well プレートに 1%,5%PRP および 1%,5%PPP 添加して 1-4 週間培養した状態でアリザリンレッド染色を行った。その後、microplate reader (Tecan Group Ltd, Zürich, Swiss)にて 550 nm で検討した。臨床面において、PRP/F 移植群と過去の移植していない群との間に統計学上の有意差は認められず、PRP/F が移植部位に留まらないことが主な原因であることから徐放化システムが必要であると考えられた。そこで、新規徐放化システムである新規のゼラチンハイドロゲルシート (GHS) を用いた(図 2)。

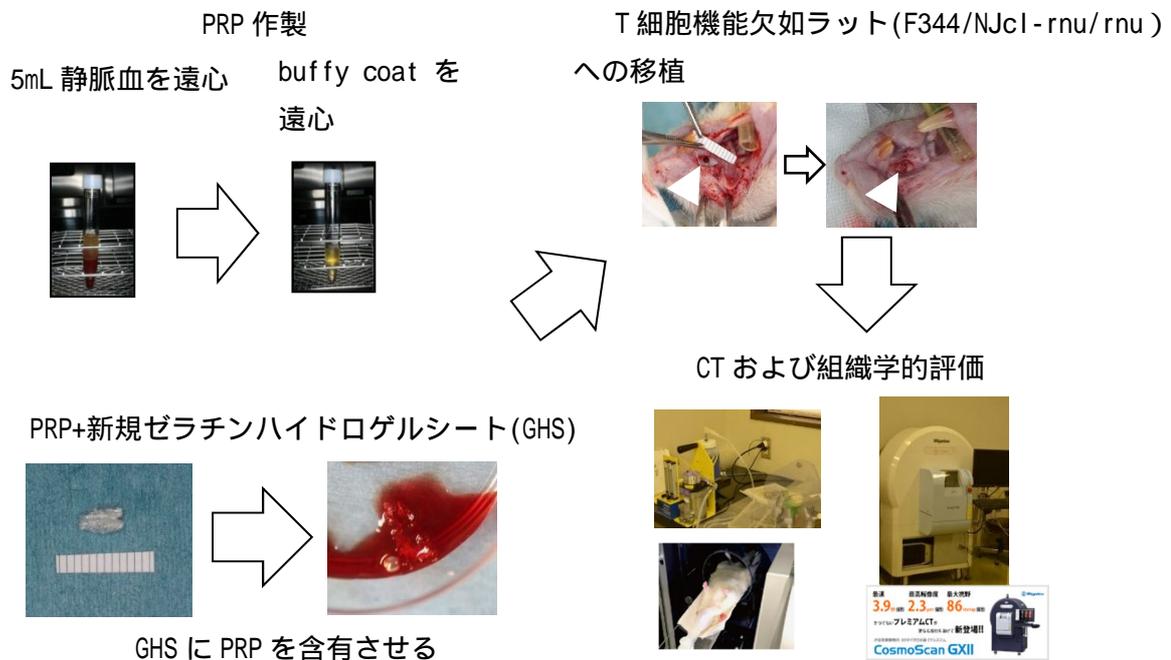


図 2 ノードラット(F344/NJcl-rnu/rnu)の顎裂部へ PRP+ゼラチンハイドロゲルシート移植

ノードラットの上顎の門歯-犬歯間に 5x2.5x1mm の骨欠損を作製し、PRP 群 PPP (platelet poor plasma)群 PRP+GHS 群 PPP+GHS 群 コントロール群の 6 群に分けて検討した (n=3)。術前後の画像は、microCT Rm_CT2 (Rigaku corporation, Tokyo, Japan) を用いて撮影された。条件設定は、90kV, 160 μA, スライス幅 120 μm (0.12 mm スライス) とした。CT 画像の解析には、医療画像ワークステーション 3D slicer (BWH and 3D slicer contributors, <https://www.slicer.org/>) を用いた。具体的には、移植直後と 2 か月後の骨欠損部を全て含むような円柱を仮定しその中の骨体積を計測した。その円柱内の骨体積の割合を比較することにより、骨形成能を統計学的に検討した (図 3)。

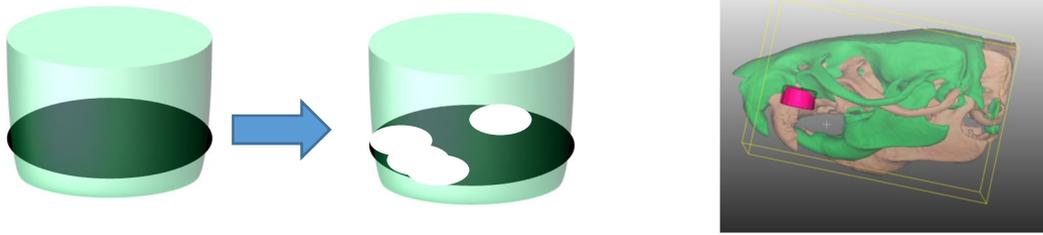


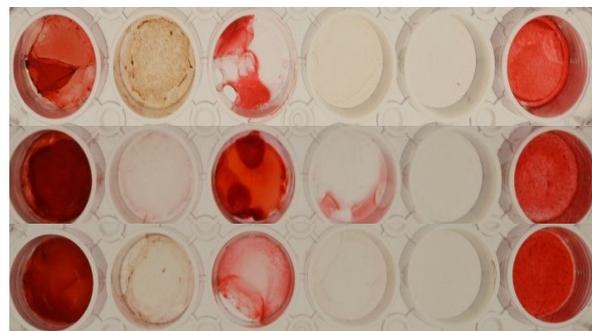
図3 3D slicer を用いた μ CT 測定

左：骨欠損部を十分に覆う程度の円柱（薄色）を設定し、同じ形状、容積の円柱に含まれる骨部分の割合を算出することで、骨欠損部の治癒過程を数値化して比較する（新生骨を円柱内の4つの円とした）。

右：ゼラチンハイドロゲルシート移植前後のCTを重ね合わせたところ（緑：移植前、茶：移植後）。

4. 研究成果

乳児ヒト PRP は、in vitro でヒト乳児骨膜細胞 (human infant Periosteum cells: hiPC) の挙動を解析した結果、ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) 非存在下で hiPC は PRP 添加群の方が増殖能と骨への分化能が高いことが判明した (図4)。



5%PRP 1%PRP 5%PPP 1%PPP
 Negative control (DMEM)
 Positive control (50%Lonza 骨分化誘導培地)

96-well プレートに 1%,5%PRP および 1%,5%PPP 添加して hiPC を 1-4 週間培養した状態でアリザリンレッド染色を行った。その後、microplate reader (Tecan Group Ltd, Zürich, Swiss)にて 550 nm で検討した結果、5%PRP 添加群が他の群と比べて有意に染色されていた。

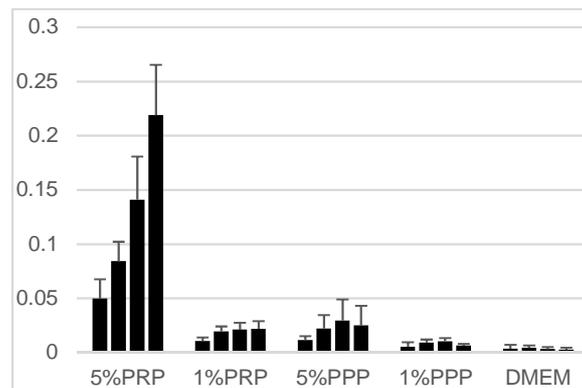


図4 PRP の骨分化能

上：アリザリンレッド染色

下：アリザリンレッド吸光度分析

2 か月後の骨体積の割合から移植直後の割合を引いた結果は、 PRP 群 : 4.2 (5.2 ± 1.4) %
 PPP 群 : 3.9 (3.9 ± 0.6) % PRP+GHS 群 :
 3.4 (2.6 ± 1.6) % PPP+GHS 群 :
 3.8 (5.4 ± 2.5) % コントロール 群 :
 3.1 (3.2 ± 0.3) %であった (図 5)。
 in vivo において移植前後の骨形成率は、各群に統計学上有意差は認められなかった。

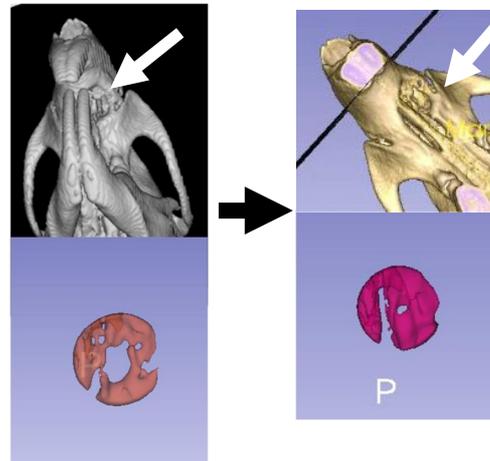


図 5 移植前の 3DCT と骨欠損部断面
 および移植後の 3DCT と骨欠損部断面

考察

PRP+GHS 群は骨形成において有意差がなかった。この原因は、ラットの顎裂部が小さいために操作が煩雑になったことがあげられ、今後症例数を増やし、検討を重ねる予定である。

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 1件）

1. 著者名 Kobayashi Shinji, Yasumura Kazunori, Mizuno Yuki, Suzuki Mayumi, Hirakawa Takashi, Satake Toshihiko, Yabuki Yuichiro, Maegawa Jiro	4. 巻 29
2. 論文標題 A procedure combining double opposing Z-plasty with buccal flap and skin graft for a cleft palate patient with short palate	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JPRAS Open	6. 最初と最後の頁 55 ~ 59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jptra.2021.04.005	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 Shinji, Mizuno Yuki, Suzuki Mayumi, Yasumura Kazunori, Hirakawa Takashi, Fukawa Toshihiko, Yabuki Yuichiro, Satake Toshihiko, Maegawa Jiro	4. 巻 75
2. 論文標題 Posterior pharyngeal wall augmentation using autologous tiered costal cartilage for velopharyngeal insufficiency	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Plast Reconstr Aesthet Surg.	6. 最初と最後の頁 e1 ~ e6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjps.2022.01.008	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 Shinji, Yabuki Yuichiro, Kokubo Kenichi, Yasumura Kazunori, Hirakawa Takashi, Fukawa Toshihiko, Yamamoto Kouji	4. 巻 75
2. 論文標題 A predictor of a postoperative fistula after double-opposing Z-plasty in bilateral cleft lip and palate patients	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Plast Reconstr Aesthet Surg.	6. 最初と最後の頁 1931 ~ 1936
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjps.2022.01.038	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

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 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、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 Kobayashi S
2. 発表標題 Primary premaxillary osteotomy with gingivoperiosteoplasty/ for complete bilateral cleft lip and palate patients/ with protrusion and/or torsion of the premaxillae
3. 学会等名 14th international cleft congress CLEFT 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林眞司
2. 発表標題 片側完全唇顎口蓋裂における初回歯肉骨膜形成術後の顎裂部骨形態評価
3. 学会等名 第46回日本口蓋裂学会学術集会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>神奈川県立子ども医療センター形成外科ホームページ https://keisei.kcmc.jp/ 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 口唇口蓋裂 http://kcmc.kanagawa-pho.jp/department/cleftlips-en.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 What are Cleft Lips and a Cleft Palates? http://kcmc.kanagawa-pho.jp/department/cleftlips-en.html Causes and Symptoms of Syndromic Craniosynostosis http://kcmc.kanagawa-pho.jp/department/crouzon-en.html Minimally Invasive Procedures for Craniosynostosis http://kcmc.kanagawa-pho.jp/department/minimally-en.html 神奈川県立子ども医療センター形成外科 外部リンク https://keisei.kcmc.jp/</p>
--

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	安村 和則 (Yasumura Kazunori) (40351621)	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・医長 (82729)	
研究 分 担 者	田中 祐吉 (Tanaka Yuukichi) (50420691)	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・医師 (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