

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：11501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20960

研究課題名（和文）家兔膝骨軟骨欠損モデルに対する末梢血由来と骨髄由来多血小板フィブリンの効果

研究課題名（英文）The effects of peripheral blood-derived and bone marrow-derived platelet-rich fibrin for osteochondral defects in rabbits

研究代表者

丸山 真博（Maruyama, Masahiro）

山形大学・医学部・助教

研究者番号：00740870

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：家兔膝骨軟骨欠損モデルに対する末梢血由来多血小板フィブリン（P-PRF）と骨髄由来多血小板フィブリン（BM-PRF）の骨軟骨修復効果について、マイクロCT解析および病理組織学的分析を行った。末梢血から作製したP-PRFを骨軟骨欠損部に移植した場合、および欠損のままとした場合と比べ、骨髄から作製したBM-PRFを移植した結果、骨軟骨欠損部は軟骨下骨の修復が促進し、硝子様軟骨組織で修復されていた。したがって、BM-PRFは骨軟骨欠損治療に寄与できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

家兔膝骨軟骨欠損モデルに対する末梢血由来多血小板フィブリン（P-PRF）と骨髄由来多血小板フィブリン（BM-PRF）の骨軟骨修復効果について調査した初めての研究であり、BM-PRFは骨軟骨欠損治療に寄与できる可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Micro-CT and histopathological analyses were performed to evaluate the effects of peripheral blood-derived platelet-rich fibrin (P-PRF) and bone marrow-derived platelet-rich fibrin (BM-PRF) on osteochondral defects in rabbits. Compared with transplanting P-PRF made from peripheral blood into the osteochondral defect or osteochondral defect only, transplantation of BM-PRF made from bone marrow accelerated the repair of subchondral bone and led to the osteochondral repair with hyaline-like cartilage tissue. Therefore, these findings suggest that BM-PRF may contribute to the treatment of osteochondral defects.

研究分野：再生医療

キーワード：再生医療 骨軟骨再生 多血小板フィブリン 骨髄

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

骨軟骨病変は急性外傷、離断性骨軟骨炎、骨壊死などにより生じ、変形性関節症へ進行し、関節機能が障害される[1]。骨軟骨病変に対する手術療法として、主に骨髄刺激法(microfracture: MF)、骨軟骨柱移植術(osteochondral autograft transplantation: OAT)、自家培養軟骨移植術(autologous chondrocyte implantation: ACI)の3つの術式が臨床現場で行われている。MFは骨軟骨病変部の母床に小さな孔を開けることにより骨髄内の間葉系幹細胞を誘導し修復を促す方法である[2]。しかし、修復部位は線維軟骨で覆われるため長期的に変形性関節症への進行することが報告されており、本術式の適応は小さな病変(2 cm<sup>2</sup>未満)に限定される[3]。OATは健全な膝関節から骨と軟骨を一塊に円柱状に採取し、骨軟骨病変に移植する方法であるが、骨軟骨柱の採取に伴う健常組織への損傷や採取可能な骨軟骨柱の採取量に限界があり、3 cm<sup>2</sup>を超える大きな骨軟骨欠損には不適切と報告されている[4]。一方、ACIは3 cm<sup>2</sup>を超える大きな骨軟骨欠損や病変に適応があるが、手術で採取した軟骨の培養期間や移植に伴う二次的手術を要することが問題となる[5]。したがって、これら現行の治療法には未だ問題がある。

多血小板フィブリン(platelet-rich fibrin: PRF)は、フィブリンがガラスに接触することで凝固する原理を下に、末梢血をガラス製の採血管に採血し抗凝固剤を添加せず遠心分離して作製されたフィブリン塊である[6]。PRFは多血小板血漿の第2世代とも呼ばれ、transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ )など様々な骨軟骨修復の促進作用を有する成長因子を2週間以上にわたり徐放性に放出する[7]。また、PRFのフィブリン塊は細胞増殖の足場として機能する[8]。申請者らは家兔膝骨軟骨欠損モデルを用いて末梢血由来PRF(P-PRF)が軟骨修復を促進することを報告した[9]。さらに、申請者らは骨髄からPRFを作製できることを報告した[10]。しかし、骨髄から作製した骨髄由来PRF(BM-PRF)の骨軟骨修復能について調査した報告がなく、未解決の課題である。

### 2. 研究の目的

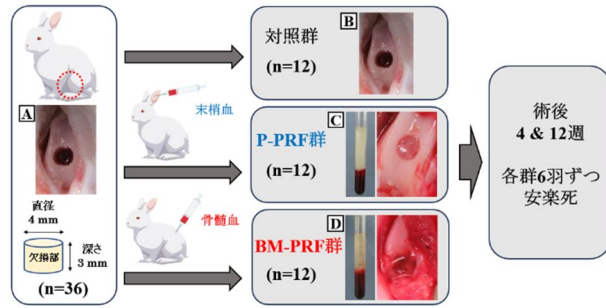
本研究の目的は家兔膝関節骨軟骨欠損に対するP-PRFとBM-PRFの効果を比較することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 動物モデルの作製

本研究は山形大学動物実験委員会より承認された(承認番号: R3154)。山形大学動物実験規程に準じて実施した。16週齢のニュージーランド白色家兔36羽を欠損のみの対照群、欠損部にP-PRFを移植したP-PRF群、および欠損部にBM-PRFを移植したBM-PRF群に無作為に分けた(各n=12)。三種混合麻酔薬(メドミジン、ミダゾラム、ブトルファノール)による全身麻酔下に手術を行った。術前に抗菌薬(エンフロキサシン)と非ステロイド性抗炎症薬(メロキシカム)を投与した。左膝の膝蓋骨溝に4mm径のフラットドリルを用いて骨軟骨欠損(直径4mm、深さ3mm)を作製した(図1A)。対照群では、欠損のみとした(図1B)。P-PRF群では耳介動脈から採取した末梢血3mLをガラス製採血管で遠心分離(1600g, 10分間, 室温)し作製したP-PRFを骨軟骨欠損部へ移植した(図1C)。BM-PRF群では腸骨から採取した骨髄血3mLをP-PRFと同じ方法でBM-PRFを作製し、骨軟骨欠損部に移植した(図1D)。術後4, 12週目にペントバルビタールナトリウムを投与し、安楽死させた後、大腿骨遠位部を摘出した。

図 1. 家兔膝関節骨軟骨欠損モデルの作製と末梢血由来多血小板フィブリン (peripheral blood-derived platelet-rich fibrin: P-PRF) および骨髓由来多血小板フィブリン (bone marrow-derived platelet-rich fibrin: BM-PRF) の調製を示すフローチャート。



(2) マイクロコンピュータ断層撮影による軟骨下骨修復の評価

術後 12 週の大腿骨遠位部を用いた 大腿骨遠位部をマイクロコンピュータ断層撮影 (micro-CT) を用いて撮像した。関心領域 (直径 4 mm, 深さ 3 mm の円柱) を骨軟骨欠損部に設置し, 矢状断方向に 10 等分し, 各スライスを ImageJ を用いて軟骨下骨部分のみを残してトリミングして骨量を計測し, その合計値を総軟骨下骨量として算出した。

(3) 病理組織学的解析

術後 4 週と 12 週の大腿骨遠位部を用いた。脱灰後, パラフィン切片を作製し, サフラニン O 染色を行い, 骨軟骨欠損部の骨軟骨修復状況について Niederauer ら[11] の評価方法に準じて組織学的に評価した。また, 術後 4 週の骨軟骨欠損部の TGF- $\beta$ 1 の発現について, 抗 TGF- $\beta$ 1 抗体を用いて免疫化学染色を行い, 骨軟骨欠損部の TGF- $\beta$ 1 染色陽性率 (骨軟骨欠損部の TGF- $\beta$ 1 染色面積を全体の面積で除して算出) を ImageJ を用いて測定した。

(4) 統計学的解析

ノンパラメトリックデータでは中央値, またはパラメトリックデータでは平均値  $\pm$  標準偏差で表記した。2 群間比較のデータは t 検定を用いて, 3 群間の場合は一元配置分散分析 one-way ANOVA と Tukey 検定または Kruskal-Wallis 検定と Post-hoc 検定, Steel-Dwass 多重比較を用いて比較した。有意水準は  $p < 0.05$  とした。

4. 研究成果

(1) BM-PRF 群では軟骨下骨量が多く, 軟骨下骨の修復が促進した。

術後 12 週における micro-CT 解析結果を図 2 に示す。BM-PRF 群では, 骨軟骨欠損部は周囲の正常な軟骨下骨の厚みと同等またはそれ以上の軟骨下骨で修復された。一方, 対照群や P-PRF 群では修復された軟骨下骨は正常に比べて菲薄で, 組織内には小さな空胞が散在し, 密度が疎であった (図 2A)。総軟骨下骨量は BM-PRF 群が他 2 群よりも有意に高値であった ( $p < 0.05$ )。

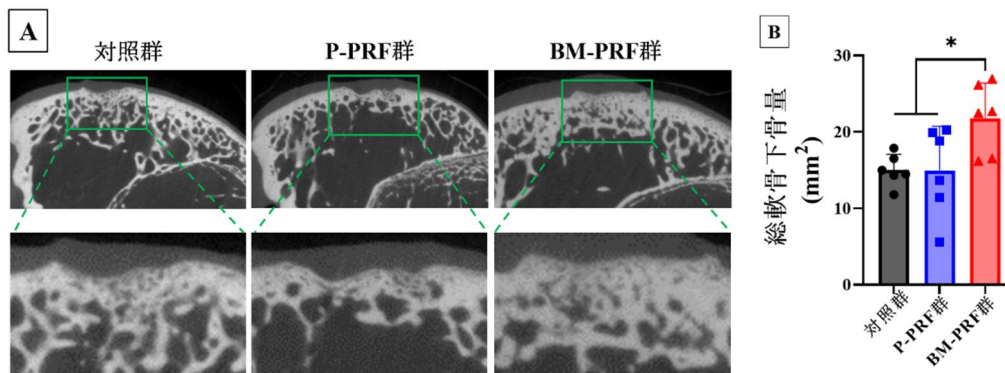


図 2. 術後 12 週における micro-CT 解析結果

(2) BM-PRF 群では骨軟骨欠損部は硝子様軟骨組織により修復された。

骨軟骨修復状況について図3に示す。術後4週では、3群とも骨軟骨欠損部に軟骨下骨が形成されていたが、硝子様軟骨は確認できず、Niederauer スコアは3群間に有意差はなかった(対照群: 9.7; P-PRF 群: 11.5; BM-PRF 群: 8.4,  $p=0.276$ )(図3A-C, G)。術後12週では、BM-PRF 群で骨軟骨欠損部が硝子様軟骨で修復された。P-PRF 群では硝子様軟骨と線維軟骨が混在した軟骨組織で修復された。対照群では主に線維軟骨で修復されていた。Niederauer スコアはBM-PRF 群が対照群よりも有意に高値であった(対照群: 11.8; P-PRF 群: 14.7; BM-PRF 群: 19.7,  $p<0.05$ )(図3D-F, G)。

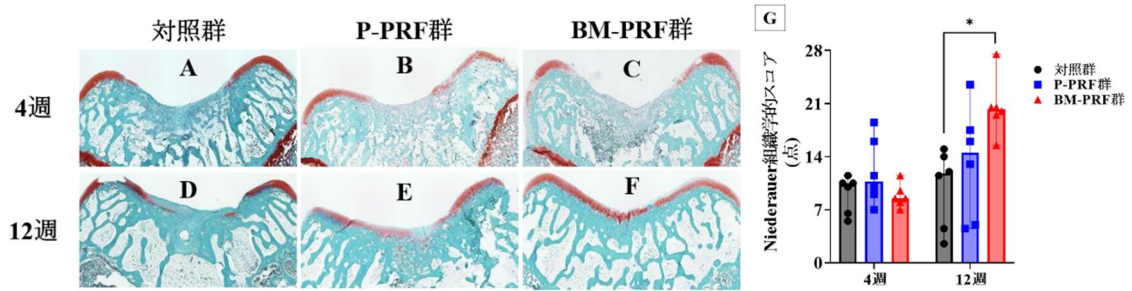


図3. 術後12週におけるmicro-CT解析結果

(3) BM-PRF 群では骨軟骨欠損部の修復組織にTGF- $\beta$ 1が高発現していた。

TGF- $\beta$ 1の免疫組織化学染色の解析結果を図4に示す。BM-PRF 群では術後4週の骨軟骨欠損部の修復組織および関節面周囲にTGF- $\beta$ 1染色領域を認めた(倍率40倍, 図4A)。発現部位を強拡大(倍率200倍)で観察すると、TGF- $\beta$ 1が細胞外基質で広範囲かつ強く発現しており、一部、細胞の核内でも発現していた(図4B)。一方、他2群ではTGF- $\beta$ 1染色領域は乏しかった。BM-PRF 群のTGF- $\beta$ 1染色陽性率は他2群よりも有意に高値であった(対照群:  $1.3\% \pm 1.3\%$ ; P-PRF 群:  $1.6\% \pm 1.1\%$ ; BM-PRF 群:  $4.9\% \pm 3.0\%$ ,  $p<0.05$ )(図4C)。

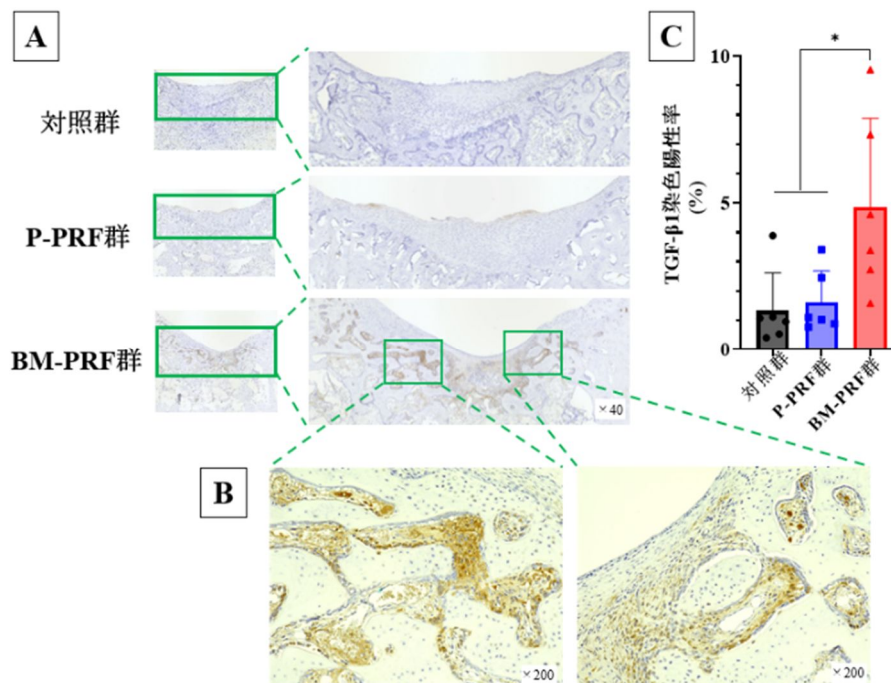


図4. 術後4週におけるTGF- $\beta$ 1に対する免疫組織化学的染色

## 5 . 結論

BM-PRF を骨軟骨欠損部に移植した結果 , 骨軟骨欠損部では TGF- 1 が高く発現し , 術後 12 週で軟骨下骨が良好に形成され , 硝子様軟骨で修復されることを明らかにした . したがって , BM-PRF は骨軟骨病変に対する新規治療法の 1 つとして臨床成績の向上に寄与できる可能性があると考えられた .

## 6 . 参考文献

1. Gorbachova, T., et al., *Osteochondral Lesions of the Knee: Differentiating the Most Common Entities at MRI*. Radiographics, 2018. **38**(5): p. 1478-1495.
2. Shapiro, F., S. Koide, and M.J. Glimcher, *Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage*. J Bone Joint Surg Am, 1993. **75**(4): p. 532-53.
3. Orth, P., L. Gao, and H. Madry, *Microfracture for cartilage repair in the knee: a systematic review of the contemporary literature*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2020. **28**(3): p. 670-706.
4. Solheim, E., et al., *Results at 10 to 14 years after osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee*. Knee, 2013. **20**(4): p. 287-90.
5. Adachi, N., et al., *Implantation of tissue-engineered cartilage-like tissue for the treatment for full-thickness cartilage defects of the knee*. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc, 2014. **22**(6): p. 1241-8.
6. Dohan, D.M., et al., *Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. **101**(3): p. e37-44.
7. Dohan Ehrenfest, D.M., et al., *Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies*. Growth Factors, 2009. **27**(1): p. 63-9.
8. de la Puente, P. and D. Ludena, *Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering*. Exp Cell Res, 2014. **322**(1): p. 1-11.
9. Maruyama, M., et al., *Comparison of the Effects of Osteochondral Autograft Transplantation With Platelet-Rich Plasma or Platelet-Rich Fibrin on Osteochondral Defects in a Rabbit Model*. Am J Sports Med, 2017. **45**(14): p. 3280-3288.
10. Uno, T., et al., *Effectiveness of Bone Marrow-Derived Platelet-Rich Fibrin on Rotator Cuff Healing in a Rabbit Degenerative Model*. Am J Sports Med, 2022. **50**(12): p. 3341-3354.
11. Niederauer, G.G., et al., *Evaluation of multiphase implants for repair of focal osteochondral defects in goats*. Biomaterials, 2000. **21**(24): p. 2561-74.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Uno Tomohiro, Maruyama Masahiro, Satake Hiroshi, Takakubo Yuya, Toyono Shuji, Xing Liu, Huang Hanqing, Yuki Issei, Suzuki Akemi, Mura Nariyuki, Takagi Michiaki	4. 巻 50
2. 論文標題 Effectiveness of Bone Marrow-Derived Platelet-Rich Fibrin on Rotator Cuff Healing in a Rabbit Degenerative Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The American Journal of Sports Medicine	6. 最初と最後の頁 3341 ~ 3354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/03635465221116084	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5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 五十嵐貴宏, 丸山真博, 黄漢卿, 宇野智洋, 花香直美, 高木理彰
2. 発表標題 家兔骨軟骨欠損に対する末梢血由来および骨髓由来多血小板フィブリンの効果
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 五十嵐貴宏, 丸山 真博, 黄漢卿, 宇野智洋, 花香直美, 鈴木朱美, 高窪祐弥, 高木理彰
2. 発表標題 家兔膝骨軟骨欠損に対する末梢血由来および骨髓由来多血小板フィブリンの効果
3. 学会等名 再生医療学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Takahiro Igarashi, Masahiro Maruyama, Huang Hanqing, Naomi Hanaka, Tomohiro Uno, Akemi Suzuki, Yuya Takakubo, Yunzhi Peter Yang, Stuart B. Goodman, Michiaki Takagi
2. 発表標題 Comparison of the effects of peripheral blood-derived and bone marrow-derived platelet-rich fibrin for osteochondral defects in rabbits
3. 学会等名 米国整形外科基礎学術集会(The Orthopaedic Research Society annual meeting) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 丸山真博, 五十嵐貴宏, 宇野智洋, 仁藤敏哉, 花香直美, 佐竹寛史, 高木理彰
2. 発表標題 野球肘の診療・研究の最前線 肘離断性骨軟骨炎に対する骨軟骨柱移植術 家兔における多血小板フィブリンを併用した骨軟骨柱移植術の効果
3. 学会等名 日本整形外科学会基礎学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Masahiro Maruyama
2. 発表標題 Osteochondral Repair using Platelet-Rich Fibrin in Rabbits
3. 学会等名 TERMIS-AP (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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2件

国際研究集会 米国整形外科基礎学術集会(The Orthopaedic Research Society annual meeting)	開催年 2024年 ~ 2024年
国際研究集会 TERMIS-AP	開催年 2023年 ~ 2023年

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		
米国	Stanford大学		