

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 24 日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462741

研究課題名(和文) 口唇口蓋裂に対する自己多血小板血漿/フィブリンを用いた顎裂部骨形成法の開発

研究課題名(英文) A development of alveolar bone formation with platelet rich plasma/fibrin technique for cleft lip and palate

研究代表者

小林 眞司 (Shinji, Kobayashi)

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：唇顎口蓋裂患児の顎裂部に骨形成促進させる目的で、「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」に基づいて自己多血小板血漿/フィブリン(platelet rich plasma/fibrin:PRP/PRF)移植を行い、不具合なく施行された。PRP/PRF中の液性因子の濃度は個人差が大きいものの、末梢血中よりも概ね高値であった。一方、基礎研究では、PRP/PRFはヒト乳児骨膜細胞において増殖を促進しないものの、組織学的には骨分化を促進させることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Platelet rich plasma/fibrin(PRP/PRF) was grafted to accelerate bone formation in alveolus of cleft lip and palate patient under `the act on the safety of regenerative medicine` issued by the Ministry of Health, Labour and Welfare. As the result, there were no problems in all patients. The concentration of cytokine in PRP/PRF tended to be higher than in peripheral blood, though there were great differences between individuals. Meanwhile, in vitro, PRP/PRF did not facilitate the proliferation of human infant osteoblast cells, but histologically facilitated the bone differentiation.

研究分野：形成外科

キーワード：口唇口蓋裂 骨移植 多血小板血漿

1. 研究開始当初の背景

唇顎口蓋裂患児に対する乳幼児期の歯肉粘骨膜形成術 (gingivoperiosteoplasty: GPP) 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。移植材料の中でも多血小板血漿/フィブリン (platelet rich plasma/fibrin: PRP/PRF) は、血小板の顆粒に含まれている PDGF, TGF- β , EGF, VEGF などの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。

2. 研究の目的

本研究の目的は、臨床において「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」(再生医療等安全性確保法) に基づいて自己 PRP/PRF を移植することで骨形成を促進させるとともに、基礎研究において PRP/PRF 中の液性因子および in vitro・in vivo での骨膜細胞の挙動を解析し、その機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) PRP/PRF の作製および移植時における最適化

PRP/PRF の作製方法は、滅菌済みのクエン酸入り試験管を用いて、全身麻酔下での手術直前に自家抹消血を 10ml 採取し、以下の手順で作製する。自家抹消静脈血 10ml 中 7ml を PRP/PRF 作製用に、3ml を血漿作製用に分ける。PRP 作製: 7 分間 900G 血漿成分と血球成分を分離し、血漿成分を 5 分間 2100G させた後に、上澄みを破棄し沈殿した PRP 約 1ml を得る。次に PRP と混合する血漿を 7 分間 900G にて血漿成分と血球成分を分離して得る。そして、PRP 1ml と血漿 0.1ml を混合して移植する。PRF 作製: 10 分間 900G にて血球成分を分離して PRF を得て、そのまま移植する。全ての操作が手術施行中の手術室内にて行われる。

(2) PRP/PRF 形状の移植時における最適化 PRP は移植時に凝固することにより組織内に留まるが、凝固しない場合は、組織内に留まることができず、市販されているゼラチンスポンジなどを利用する。一方、PRF は、フィブリンを除かないため、血小板を濃縮させながら凝固させる。最終的に、顎裂部への移植用にはどのような形状が最適であるかを検討する。

(3) PRP/PRF 中の血小板および液性因子の濃度測定

PRP/PRF 中には、PDGF-bb, VEGF, TGF- β_1 , TGF- β_2 などの液性因子が含まれており、これらの因子を明らかにする。また、これらの濃度を測定するとともに、同一症例での末梢血中に含まれている液性因子の濃度との比較検討を

行う。

(4) Computed Tomography(CT)による顎裂部の骨形成の定量的評価法の確立 移植後 6 ヶ月~5 年後に CT により顎裂部骨形成を評価する。矯正歯科医により骨形成の程度が評価され、その後 SBG の適否が判断される。具体的には、CT における顎裂部の評価法を確立する。

(5) ヒト乳児骨膜細胞の in vitro 解析 手術時に余剰となり廃棄される顎裂部骨膜を組織学的に解析し、骨形成の機序を探求する。具体的には、顎裂部骨膜を H&E、 α -type コラーゲン染色を行う。またヒト乳児骨膜細胞の増殖および分化能を検討する。具体的には、in vitro において倫理委員会で承認を得た手術で破棄するヒト乳児骨膜細胞を得るとともに、細胞懸濁液は、37℃, CO₂ 5% に設定したインキュベータで 10% fetal bovine serum, 1% Antibiotic Antimycotic Solution を含有する Dulbecco's modified Eagle medium を含む増殖培地により培養を行った。各培養条件におけるヒト乳児骨膜細胞の増殖能を定量化するにあたり、MTT 試験を施行した。

PDGF-bb, VEGF, TGF- β_1 , TGF- β_2 などの各種液性因子の発現を調べる。また、これら液性因子の濃度を変えて、ヒト乳児骨膜細胞の挙動を観察することにより至適な "PRP/PRF" 濃度を推測する。

4. 研究成果

(1) PRP/PRF の作製

PRP は、2 回遠心法により作製することができた。一方、PRF は、900G 10 分間の 1 回の遠心法で作製することができた。

(2) PRP/PRF 形状の移植時における最適化 PRP は市販のゼラチンスポンジなどを利用して移植した。一方、PRF は、血小板濃縮を維持しながら凝固させることができた。従って、両者とも顎裂部へ移植することが可能であった。

(3) PRP/PRF 中の血小板および液性因子の濃度測定

生後 5-7 ヶ月齢の PRP/PRF 中に含まれる血小板および液性因子の濃度測定を検討した。血小板と液性因子の濃度を末梢血中および PRP 中で測定した。その結果、血小板濃度: 末梢血 33.8 ± 8.8 PRP 49.5 ± 72.3 、血小板由来成長因子 (PDGF) 濃度: 末梢血 7376.7 ± 1874.8 、PRP 5663.7 ± 6727.2 、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 濃度: 末梢血 493.6 ± 120.5 、PRP 524.1 ± 627.2 、トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β_1) 濃度: 末梢血 22.5 ± 11.7 、PRP 29.3 ± 36.5 と個人差が大きいものの、末梢血中よりも PRP 中の濃度の方が概ね高値であった (図 1)。

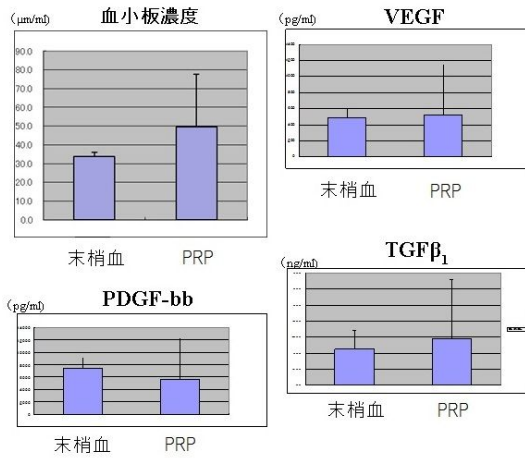


図1 血小板および液性因子濃度

(4) Computed Tomography(CT)による顎裂部の骨形成の定量的評価法の確立
PRP/PRF 移植 5 年後の症例に対して、骨形成を CT 評価し、矯正歯科医により評価法が確立された。具体的には、歯槽頂から梨状孔縁までの高さが 12mm 以上を「骨形成が十分」とし、歯槽頂から梨状孔縁までの高さが 12mm 未満を「骨形成が不十分」と判断した。

(5) ヒト乳児骨膜細胞の *in vitro* 解析
組織学的解析を行い、ヒト乳児の顎裂部骨膜を同定することができた。実体顕微鏡下で骨膜組織だけを分離し、骨膜細胞を *in vitro* において培養・保存することに成功した。増殖能に関しては MTT 試験により細胞倍加時間は 31.3 ± 4.6 時間 ($n=4$) であり、極めて高い増殖能を示した (図 2)。

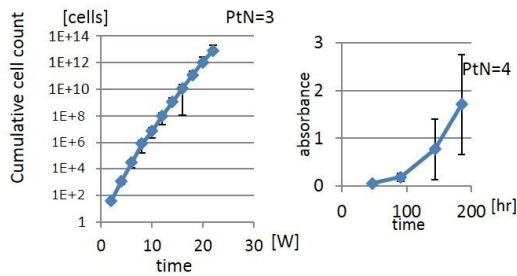


図2 ヒト乳児骨芽細胞の増殖能

ヒト乳児骨膜細胞の培養の結果からヒト乳児骨膜細胞は極めて高い増殖能を有していたが、PRP 添加群は、乏血小板血漿 (platelet poor plasma: PPP) 添加群よりも増殖能が劣っていた (図 3)。

また、PDGF-bb, VEGF, TGF- β_1 , TGF- β_2 を添加して細胞増殖を検討した結果、4 つの液性因子とも、添加した方が増殖能が低下することが判明した (図 4)。

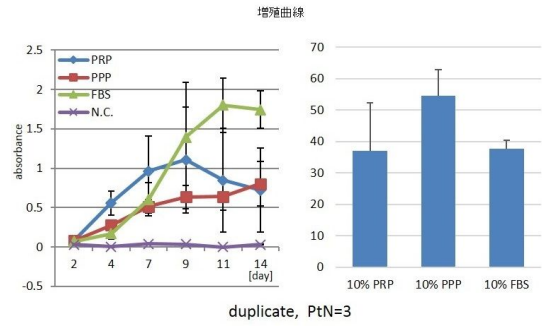


図3 ヒト乳児骨芽細胞における PRP/PPP 添加群の増殖能

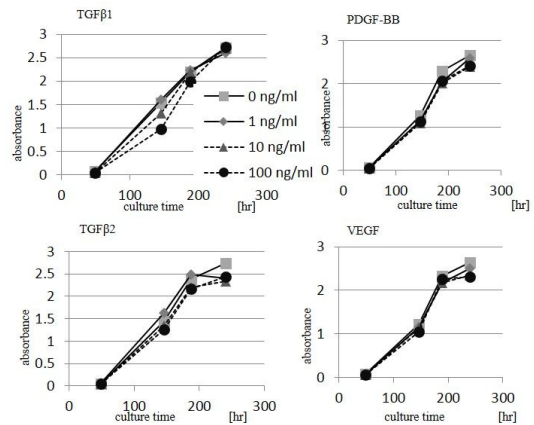


図4 添加する液性因子濃度の違いにおけるヒト乳児骨芽細胞の増殖能

一方、ヒト乳児骨膜細胞は、骨へ分化することが判明し、PRP 添加群の方が PPP 添加群よりも骨形成能が高いことが組織学的に示唆された (図 5)。

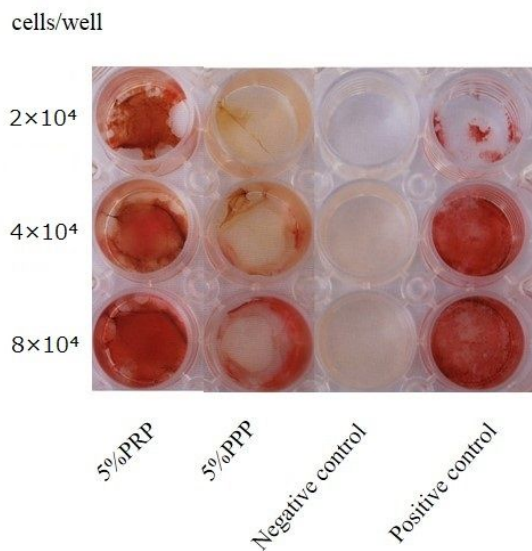


図5 ヒト乳児骨芽細胞における PRP/PPP 添加群の骨分化能の違い

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

小林眞司、術前矯正を組み合わせた両側口唇裂初回手術、Pepars、No89、査読なし、2014、80-89

小林眞司、Furlow 法による口蓋裂初回形成術、Pepars、No.96、査読なし、2014、1-11
S Kobayashi, T Hirakawa, T Fukawa, J Maegawa. Maxillary growth after maxillary protraction Appliance in conjunction with pre-surgical orthopedics, gingivoperiosteoplasty and Furlow palatoplasty for complete bilateral cleft lip and palate patients with protruded premaxilla. J Plast Reconstr Aesthet Surg、査読有、13 Feb 2015.68(6):758-763、DOI: 10.1016/j.bjps.2015.02.005.

小久保健一、小林眞司、小野澤久輔、安岡裕司、平川崇、府川俊彦、前川二郎、Furlow 法における口蓋粘膜の閉鎖判定法日本口蓋裂学会雑誌、40(1)、査読有、2015、1-6

[学会発表](計 10 件)

S Kobayashi, T Hirakawa, K Yasumura, Y Sasaki, T Fukawa, J Maegawa, Primary Premaxillary Osteotomy with cheiloplasty for bilateral cleft lip and palate (BCLP) patients with protrusion and/or torsion of premaxillae, The 13th Congress of the international confederation of cleft lip/palate and related craniofacial surgery, 2017.2.8-11, Chennai (India)
矢吹雄一郎、安村和則、福井厚子、田中祐吉、新保裕子、前川二郎、小林眞司、乳児多血小板血漿(PRP)の骨形成に対する作用、第 25 回形成外科学会基礎学術集会、2016.9.15-16、ナレッジキャピタルコングレ・コンベンションセンター(大阪府大阪市)

小林眞司、平川崇、府川俊彦、佐々木康成、前川二郎、シンポジウム「両側性口唇裂の形成術」、両側唇顎口蓋裂に対する術前顎矯正を組み合わせた初回手術、第 40 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2016.5.26-27、ナレッジキャピタルコングレ・コンベンションセンター(大阪府大阪市)

S Kobayashi, The surgical treatment linked with the pre-surgical orthodontics for unilateral complete cleft lip and palate、The 13th Japan-Korea congress of plastic and reconstructive surgery, 2016. 5.15-17、ANA クラウンプラザホテル金沢(石川県

金沢市)

小林眞司、平川崇、府川俊彦、佐々木康成、前川二郎、ビデオシンポジウム「口唇形成術の要点」中間顎が突出・偏位した両側唇裂に対する中間顎骨切り術を併用した口唇・顎初回手術、第 59 回日本形成外科学会総会学術集会、2016.4.13-15、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

山田峻之、小林眞司、矢吹雄一郎、塚本歩、野里朋代、片側唇顎裂において顎裂形態が歯肉骨膜形成術に与える影響、第 33 回日本頭蓋顎顔面外科学会学術集会、2015.11.12-13、宝塚ホテル(兵庫県宝塚市)

小林眞司、シンポジウム「口蓋裂手術に対する考え方と方法」Furlow 法による口蓋形成術の考え方と方法 - 再現性のある良好な結果を目指して-、第 39 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2015.5.21-22、シェーンバツハサボー砂防会館(東京都千代田区)

小林眞司、小久保健一、小野澤久輔、安岡裕司、平川崇、佐々木康成、府川俊彦、前川二郎、両側唇顎口蓋裂に対する術前顎矯正治療を組み合わせた治療法、第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014.5.29-30、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

小林眞司、平川崇、佐々木康成、府川俊彦、前川二郎、シンポジウム顎裂の再建戦略 術前顎矯正と歯槽歯肉骨膜形成術による顎裂の再建戦略、第 38 回日本口蓋裂学会総会・学術集会、2014.5.29-30、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

小林眞司、小久保健一、小野澤久輔、安岡裕司、平川崇、府川俊彦、佐々木康成、前川二郎、両側裂に対する術前顎矯正治療に依存した治療方針、第 57 回日本形成外科学会総会学術集会、2014.4.9-11、NCC&スタジオ(長崎県長崎市)

[図書](計 0 件)該当なし

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)該当なし

取得状況(計 0 件)該当なし

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 眞司(KOBAYASHI, Shinji)

神奈川県立こども医療センター・臨床研究所・部長

研究者番号: 90464536

(2)研究分担者

田中 祐吉 (TANAKA, Yukichi)

神奈川県立こども医療センター・臨床研究
所・臨床研究所長

研究者番号：50420691