

学 位 論 文 題 名

多血小板血漿による骨形成促進効果

－マウス骨折モデルを用いた評価－

学位論文内容の要旨

【緒言】

近年、骨組織再生をもたらす治療法として、多血小板血漿 (platelet-rich plasma: PRP) を局所に投与する試みが数多く行われている。この PRP 中には、各種細胞増殖因子が含まれており、これらの細胞増殖因子群が複雑かつ相互に作用するメカニズムの下で働いて骨形成を促進するものと考えられている。また、これらの増殖因子は普段は血小板の α 顆粒中に貯留されているが、脱顆粒する際に分泌されるものと考えられており、この脱顆粒を起こす原因として血液凝固反応により活性化されるトロンビンによる刺激などがあげられる。 α 顆粒から分泌される細胞増殖因子には、主に血小板由来成長因子(PDGF)、腫瘍細胞増殖因子- β (TGF- β)、インスリン様成長因子- I (IGF-I)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)などが含まれている。これらの細胞増殖因子の全てが協奏的に働くことで、生体内での骨形成が正常に行われると考えられているが、その詳細なメカニズムの全てが明らかにされたわけではない。また、先に述べた PRP を用いた骨組織再生療法においても、PRP 中のどの成分が、どのようなメカニズムで骨形成を促進しているのかについての詳細は明らかにされておらず、またそれを調査するための良い評価系は樹立されていない。

1984 年に Bonnarens と Einhom により発表された実験的骨折モデルは、その後多くの研究がなされており、骨折部治癒過程を評価する実験系として確立されたモデルである。骨折治癒は胎生期における骨形成と類似しており、軟骨形成、軟骨の吸収と線維骨の形成および線維骨のリモデリングと層板骨の形成という過程をたどり、骨形成の様々な状態を観察することができる。そこで本研究では、新たにマウス大腿骨骨折モデルをその評価法に用い、骨折治癒に対する PRP 由来成分の作用を評価した。

【材料と方法】

5 週齢の雄 ICR マウスに全身麻酔を行った後、26 匹のマウスから心臓採血法により約 0.8 ml/匹採血し、全体として約 20 ml 採取した。Citrate-Phosphate-Dextrose solution をあらかじめシリンジ内に 0.15 ml 採取しておき、抗凝固剤として使用した。採血した全血液は第一段階として 200 g で 10 分間（室温）遠心分離を行い、赤血球分画（下層）と血漿分画（上層）に分かれたうちの血漿分画を別の容器に移した。第二段階として、分離した血漿分画を 250 g で

10 分間(室温)再び遠心分離を行い、下部の 3 ml を PRP、残りの成分を乏血小板血漿(Platelet-Poor Plasma: PPP)とした。PRP 中の血小板をトロンビン処理して活性化するため、牛トロンビン 1,000 U を 10% 塩化カルシウム水溶液 10 ml に溶解したものを作製し、PRP とトロンビン・塩化カルシウム水溶液を体積比 9 : 1 の割合で混合した。その後、18,000 g で 10 分間の遠心分離を行い、凝固したフィブリン成分や血球成分を取り除き、残りの上澄みを PRP-released supernatant (PRPS) として採取し、実験に使用した。

5 週齢の雄 ICR マウスに全身麻酔かけた後、左大腿骨髓腔内に 25 G の注射針を長軸方向に刺入し骨内固定を行い、骨幹部中央で徒手法により大腿骨を骨折させた。骨折から 1 日後、同部に PRPS、あるいは同量の phosphate buffered saline (PBS)を 27G の注射針と 1ml シリンジで骨折部骨膜下に 20 μ l 注入したものをそれぞれ PRP 群、対照群とした。放射線学的検索では、SOFTEX CSM-2 を用いて大腿骨骨折部の X 線写真を撮影し、X 線写真上で骨折部の治癒状態、仮骨の形成状態を検索した。組織学的検索では、試料は通法に従い、10%中性ホルマリンにて固定後、EDTA 脱灰を行い、パラフィン包埋し、5 mm の切片を作成した。その後、アルシアン・ブルー染色を行い、光学顕微鏡下で組織学的に検索した。

【結果】

放射線学的所見

骨折後 7 日目では PRP 群、対照群ともに骨折部仮骨形成は顕著ではなかった。骨折後 14 日目になると仮骨の全体像が不透過像として確認でき、明らかに PRP 群の仮骨形成量が対照群を有意に上回っていた。骨折後 21 日目では PRP 群、対照群ともに仮骨の大きさは減少し骨折後各時点での仮骨としての膨隆はほぼ認められなくなった。

組織学的所見

骨折後 7 日目においては、PRP 群と対照群との間に組織学的に大きな差異は認められなかった。いずれの組織像においても、骨折線部を中心として膨隆する仮骨の形成が認められた。また、主として未成熟な軟骨組織が全体を占め、物理的な骨膜反応性の骨形成も認められた。骨折後 14 日目においては、仮骨の大きさは増大し、軟骨組織の増加、成熟、吸収が見られた。7 日目に比べて仮骨内の軟骨組織は成熟し、肥大軟骨組織がよく観察されたが、一部は吸収され線維骨の形成も認められた。PRP 群では対照群と比較して軟骨組織の吸収がより進み、線維骨へのより多くの置換が認められた。骨折後 21 日目では、仮骨の大きさはリモデリングにより減少した。PRP 群では大部分の軟骨組織は吸収され、線維骨に置換されていた。一方、対照群では、PRP 群と同様に軟骨組織は吸収され、線維骨に置換されていたが、PRP 群と比較してより多くの軟骨組織が残存しているのが認められた。

【考察】

近年、PRP を利用し局所の骨再生能力を高めようという試みが、数々の動物モデルを用いて行われ好成績が報告されている。しかしながら、マウスの骨欠損モデルに対する PRP の影響やイヌの骨欠損モデルに対する影響などの報告によれば、PRP による骨形成への促進的な効果は認められないとあり、その評価はいまだに定まっていない。また、in vitro における研究においても、間葉系幹

細胞からの骨芽細胞への分化に対して、PRPの有効性を認めるもの、歯根膜細胞への効果を報告するものがあるが、そのような効果はないとする報告もあり、いまだにその効果については意見が分かれている。

本研究では、骨内固定を伴うマウス大腿骨骨折モデルを用いて骨折治癒におけるPRPの作用を評価した。その結果、PRP投与群では、対照群に比較して骨折後14日目の仮骨の形成量が多いこと、またその後、14日および21日目での軟骨組織の吸収が早いことから、PRP投与により、骨折治癒におけるリモデリングが促進する可能性が考えられた。

【結論】

骨内固定を応用したマウス骨折モデルを用いて、多血小板血漿（PRP）由来成分が骨折治癒におよぼす影響について調査したところ、PRPSの骨折部への投与により骨折部仮骨の形成量が増大すること、また、骨折部治癒過程における軟骨組織の消失時期が早まることが明らかになった。また、本研究により、PRP中の何らかの成分が、骨折部治癒過程における骨のリモデリングサイクルを早める可能性が明らかになった。

学位論文審査の要旨

主査	教授	北川善政
副査	教授	田村正人
副査	教授	進藤正信
副査	助教授	石崎明

学位論文題名

多血小板血漿による骨形成促進効果

－マウス骨折モデルを用いた評価－

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

本研究は、多血小板血漿(platelet-rich plasma: PRP)を用いた骨組織再生療法において PRP の骨形成促進に対する影響を調べるために、実験的マウス大腿骨骨折モデルをその評価法に用い、骨折治癒に対する PRP 由来成分の作用について検討したものである。

PRP の調製は、5 週齢の雄 ICR マウス 26 匹から心臓採血法により約 0.8 ml/匹採血し、全体として約 20 ml 採取した。採血した全血液は第一段階として 200 g で 10 分間(室温)遠心分離を行い、赤血球分画(下層)と血漿分画(上層)に分かれたうちの血漿分画を別の容器に移した。第二段階として、分離した血漿分画を 250 g で 10 分間(室温)再び遠心分離を行い、下部の 3 ml を PRP、残りの成分を乏血小板血漿(Platelet-Poor Plasma: PPP)とした。PRP 中の血小板をトロンビン処理して活性化するため、牛トロンビン 1,000 U を 10% 塩化カルシウム水溶液 10 ml に溶解したものを作製し、PRP とトロンビン・塩化カルシウム水溶液を体積比 9 : 1 の割合で混合した。その後、18,000 g で 10 分間の遠心分離を行い、凝固したフィブリン成分や血球成分を取り除き、残りの上澄みを PRP-released supernatant (PRPS) として採取し、試料とした。次に、5 週齢の雄 ICR マウスに全身麻酔後、左大腿骨髓腔内に 25 G の注射針を長軸方向に刺入し骨内固定を行い、骨幹部中央で徒手法により大腿骨を骨折させた。骨折から 1 日後、同部に PRPS、あるいは同量の phosphate buffered saline (PBS)を 27G の注射針と 1ml シリンジで骨折部骨膜下に 20 ml 注入したものをそれぞれ PRP 群、対照群とした。放射線学的検索では、SOFTEX CSM-2 を用いて大腿骨骨折部の X 線写真を撮影し、X 線写真上で骨折部の治癒状態、仮骨の形成状態を検索した。骨折後 7 日目では PRP 群、対

照群ともに骨折部仮骨形成は顕著ではかった。骨折後 14 日目になると仮骨の全体像が不透過像として確認でき、明らかに PRP 群の仮骨形成量が対照群を有意に上回っていた。骨折後 21 日目では PRP 群、対照群ともに仮骨の大きさは減少し骨折後各時点での仮骨としての膨隆はほぼ認められなくなった。組織学的検索では、試料は通法に従い、10%中性ホルマリンにて固定後、EDTA 脱灰を行い、パラフィン包埋し、5 mm の切片を作成した。その後、アルシアン・ブルー染色を行い、光学顕微鏡下で組織学的に検索した。骨折後 7 日目においては、PRP 群と対照群との間に組織学的に大きな差異は認められなかった。いずれの組織像においても、骨折線部を中心として膨隆する仮骨の形成が認められた。また、主として未成熟な軟骨組織が全体を占め、物理的な骨膜反応性の骨形成も認められた。骨折後 14 日目においては、仮骨の大きさは増大し、軟骨組織の増加、成熟、吸収が見られた。7 日目に比べて仮骨内の軟骨組織は成熟し、肥大軟骨組織がよく観察されたが、一部は吸収され線維骨の形成も認められた。PRP 群では対照群と比較して軟骨組織の吸収がより進み、線維骨へのより多くの置換が認められた。骨折後 21 日目では、仮骨の大きさはリモデリングにより減少した。PRP 群では大部分の軟骨組織は吸収され、線維骨に置換されていた。一方、対照群では、PRP 群と同様に軟骨組織は吸収され、線維骨に置換されていたが、PRP 群と比較してより多くの軟骨組織が残存しているのが認められた。

骨内固定を応用したマウス骨折モデルを用いて、多血小板血漿(PRP)由来成分が骨折治癒におよぼす影響について調査したところ、PRPS の骨折部への投与により骨折部仮骨の形成量が増大すること、また、骨折部治癒過程における軟骨組織の消失時期が早まることが明らかになった。また、本研究により、PRP 中の何らかの成分が、骨折部治癒過程における骨のリモデリングサイクルを早める可能性が明らかになった。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について質問が行われた。主な質問事項は、1) PRP 中の成長因子の相互作用について、2) 骨折モデルで出現する軟骨細胞の由来と VEGF との関連、3) 臨床的に PRP の骨増生に対する作用、4) 骨折治癒における内骨膜、外骨膜について、等であった。これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、PRP 投与が骨折部治癒過程において骨のリモデリングサイクルを早めることを示したものであり、その内容が高く評価された。申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められ、さらに骨の再生や腫瘍の骨吸収についての研究にも興味を示しており、将来性についても評価された。本研究業績は骨折、インプラント治療のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士(歯学)の学位に値するものと認められた。