

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 小林 美登
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第294号
学位授与の日付 平成26年3月24日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use
(PRF膜の臨床応用のための標準化プロトコール)

論文審査委員 主査 教授 吉江 弘正
副査 教授 泉 健次
副査 准教授 川瀬 知之

博士論文の要旨

今回提出された博士論文の要旨については下記のとおりである。

【背景と目的】

現在、広く臨床で用いられている PRF の圧延法は乾燥ガーゼで押しつぶすというものである。ガーゼによる圧延には PRF 表面の血小板への損傷や血漿成分の喪失といったデメリットが懸念されるため、PRF 膜の作製法を標準化し、この損失を最小限に抑えることが重要である。そこで、より臨床上有用な PRF 膜の作成のための「標準化 PRF 膜」作成用の器具を試作し、その有用性について検証することを目的とした。

【材料と方法】

試作した PRF 膜作成用の compressor はステンレス製で、上下 2 枚のスプーン状のパーツからなり、1mm の間隙を持たせた。PRF は健康なボランティア 5 名から末梢血を採取し、Medifuge system により遠心後、赤血球層から切り離したものとし、試作 compressor で作成した PRF 膜を C-PRF、乾燥ガーゼで圧延した従来通りの PRF 膜を G-PRF とした。また、PRF の血小板の局在は表面の観察を SEM で行い、膜内部の血小板については抗 CD-41 免疫染色にて確認した。PRF に含まれる増殖因子についてはホモジナイズしたサンプルによる Growth factor antibody microarray で検出を行った。PRF 膜の細胞増殖活性をヒト線維芽細胞 (Gin-1 細胞) による細胞増殖試験で、血管新生への影響を ex vivo assay の鶏胚漿尿膜法並びに in vitro でのヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) での scratch assay にて評価した。統計には student t-test と ANOVA を用い、P value < 0.05 で検定を行った。

【結果】

PRF を膜状整形したため、C-PRF では 84%、G-PRF では 98% の重量の低下が認められた。SEM による PRF の表面観察では赤血球創に近接する region #1 で多くの血小板や血球が観察された。C-PRF と G-PRF の表面性状をみると C-PRF では G-PRF と比較し表面を広く血小板が覆っており、フィブリン線維の形状も保たれていた。また、C-PRF には膜内部と表面に CD-41 陽性の血小板が観察されたのに対し、G-PRF では膜内部にしか CD-41 陽性細胞が確認出来なかった。Gin-1 細胞による細胞増殖試験では C-PRF 添加群で有意に細胞増殖が促進され、マイクロアレイにより検出された細胞増殖因子レベルも C-PRF の方が G-PRF に勝っていた。CAM assay では C-PRF 周囲で新血管形成と既存血管の誘導が有意に高く認められ、in vitro でも C-PRF は血管内皮細胞の増殖・遊走能を著しく増強した。

【考察】

本研究の結果、PRF 内部での血小板の局在には偏りが認められるため、特に「細胞増殖因子の供給源とする

場合」には血小板を多く含む部位を選択的に使用する必要がある。また、PRF中の血漿成分にも多くの細胞増殖因子が含まれており、過剰な血漿成分の喪失も避けるべきであろう。PRFの細胞増殖因子レベルはドナーによって大きく変わることが知られており、PRFでも同様の個体差が考えられるが、ゲル状で得られるPRFでは血小板数の調節を行えないため、臨床では血小板の多く含まれる部位の使用と調整法による増殖因子の喪失の予防とが、PRFの生物活性を効果的に利用するには重要である。

【結論】

PRFをcompressorにて膜状整形することにより標準化され、このPRF膜は、再生材料としての特性を有することが示された。

審査結果の要旨

Choucronの提唱した多血小板フィブリン(PRF)は多血小板血漿(PRP)と同様の患者自己血由来の血小板濃縮材料であるが、ゲル化に外来因子を必要とせず、PRFよりも単純な方法で短時間に作成できる。PRFの臨床応用に際しては、移植部に適合するよう膜状に圧延し整形されることが多い。今広く臨床で用いられているPRFの圧延法は乾燥(もしくは湿潤させた)ガーゼで押しつぶすというものである。ガーゼによる圧延にはPRF表面の血小板への損傷や血漿成分の喪失といったデメリットが懸念されるため、PRF膜の作製法を標準化し、この損失を最小限に抑えることがPRFの臨床成績を正確に評価する上でも重要である。そこで、より臨床上有用なPRF膜の作成のための「標準化PRF膜」作成用の器具を試作し、その有用性について検証した。以上のことから、本研究の目的は、特に臨床的側面からも妥当性があり、かつ新規性、独創性が認められる。

その結果、PRFは膜状整形する際に血漿成分をほとんど流出し、C-PRFでは84%、G-PRFでは98%の重量の低下が認められた。SEMによるPRFの表面観察では赤血球創に近接するregion #1で多くの血小板や血球が観察された。C-PRFとG-PRFの表面性状を比較するとC-PRFではG-PRFと比較し表面を広く血小板が覆っており、フィブリン線維の形状も保たれていた。さらに、CD-41免疫染色ではC-PRFには膜内部と表面にCD-41陽性の血小板が観察されたのに対し、G-PRFでは膜内部にしかCD-41陽性細胞が確認出来なかった。Gin-1細胞による細胞増殖試験ではC-PRF添加群で有意に細胞増殖が促進され、マイクロアレイにより検出された細胞増殖因子レベルもC-PRFの方がG-PRFに勝っていた。血管新生を評価するCAM assayではC-PRF周囲で新血管形成と既存血管の誘導が有意に高く認められ、in vitroでもC-PRFは血管内皮細胞の増殖・遊走能を著しく増強した。

これらの結果を導いた実験系をみると、試作したPRF膜作成用のcompressorはステンレス製で、上下2枚のスプーン状のパーツからなる。圧延時、両パーツ間に1mmの間隙を持たせるようストッパーを設置し、下方のパーツにはPRF保持と排液の速やかな流出のための小孔を設けてあり、極めて独創的な構造となっている。PRFは健康なボランティア5名から末梢血を採取し、Medifuge systemにより遠心後、中央のフィブリング層を赤血球層から切り離したものとし、試作compressorで作成したPRF膜をC-PRF、乾燥ガーゼで圧延した従来通りのPRF膜をG-PRFとした。両者を比較検討することで、客観性が得られたと考えられる。PRFの血小板の局在は表面の観察をSEMで行い、膜内部の血小板については抗CD-41免疫染色をおこない、PRFに含まれる増殖因子についてはPRF膜をホモジナイズしたサンプルによるGrowth factor antibody microarrayにて検出する方法であり、再生評価として正統性がみとめられる。PRF膜の細胞増殖活性をヒト線維芽細胞(Gin-1細胞)による細胞増殖試験で、血管新生への影響をex vivo assayの鶏胚漿尿膜法並びにin vitroでのヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)でのscratch assayにて解析した。細胞増殖や細胞遊走に関して、上記のように複数の測定法で確認する点も高く評価したい。

最終結論として、PRFをcompressorにて膜状整形することにより標準化され、このPRF膜は、再生材料としての特性を有することが明確に示された。本研究の目的の臨床的意義、研究デザインの妥当性と正統性のある実験系、測定方法の再現性と堅実性、結果からの結論への展開の妥当性も十分である。これらの点から総合的、客観的にみて、本研究論文は、学位論文としての価値が十分に認められる。