

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 堀水 慎
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第296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 An improved freeze-dried PRP-coated biodegradable material suitable for connective tissue regenerative therapy
(結合組織再生治療のための、吸収性凍結乾燥PRP スポンジの開発)

論文審査委員 主査 教授 吉江 弘正
副査 教授 泉 健次
副査 教授 朔 敬

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】

多血小板血漿 (platelet-rich Plasma;PRP) は、血小板由来の増殖因子を豊富に含むことから組織再生療法に応用されてきた。しかし、操作性と緊急時の対応に課題がある。そこで、先行研究において Polyglactin 910 メッシュと複合化した凍結乾燥PRP を考案した。本研究では、起炎性の軽減と生体親和性の向上を目的として、複合化する基材をコラーゲンスポンジに変更し、凍結乾燥PRP の改良を試みた。

【材料と方法】

ヒト静脈血から調製したPRP をコラーゲンスポンジ (Terudermis® :10x10x2 mm) に室温で3分間含浸させ、凍結乾燥処理によりPRP スポンジを作製した。4℃で3週間保存後、実験に供した。PRP スポンジに含まれる増殖因子は抗体アレイにより、表面性状と粘弾性はそれぞれ走査型電顕(SEM) と原子間力顕微鏡(AFM) により評価した。ヒト培養骨膜細胞の増殖に及ぼす影響については、WST-8 を用いて比色定量的に評価した。PRP スポンジにヒト骨膜細胞を播種し、細胞形態と細胞増殖をSEM および組織標本により評価した。また、ヌードマウス背部皮下へ移植し、その組織修復への影響を免疫化学組織染色(PCNA、 α SMA) によって評価した。

【結果】

コラーゲン線維表面に多数の血小板付着と形成されたフィブリンメッシュを認めた。そのため、コラーゲン単独の場合と比較して水中で有意に低い粘弾性を示した。凍結乾燥PRP スポンジには、凍結PRP と同等の増殖因子 (e. g., PDGF-BB, PDGF-AB, IGF-2, FGF4) が保存されており、ヒト骨膜細胞の増殖を促進した。動物移植においては、炎症性細胞の浸潤は軽微であり、特にPRP スポンジ周辺の組織にPCNA、 α SMA 陽性の細胞を多数認めた。

【考察】

コラーゲンスポンジは厚みのある形状からPRP 含浸性に優れ、構造的には血小板保持に適性を持つことが観察された。さらに凍結乾燥処理後も増殖因子の活性が保たれることを示している。PRP スポンジに播種した細胞はフィブリンメッシュに覆われて球状の細胞形態を示しており、細胞伸展の抑制がスポンジ内部の細胞増殖を抑制していることが考えられる。生体内においては、周囲組織からプラスミンをはじめとした分解酵素がフィブリンを分解するために、PRP スポンジ内部への血管、細胞侵入を妨げることなく、保存された増殖因子による組織修復の促進が起こることが示唆される。

【結論】

PRP をコラーゲンスポンジと複合化して凍結乾燥することにより、PRP の生理活性を長期的に保存できることが示された。生体親和性の向上、起炎性軽減を達成できた。臨床的にはPRP の操作性と緊急的な対応において有意義なものになる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

多血小板血漿 (platelet-rich Plasma;PRP) は、PDGF-AB や TGF- β 1 など、血小板由来の増殖因子を豊富に含むことから組織再生療法に広く応用されている。しかし、液状であるためハンドリングの難しさや、2 回の遠心操作が必要など調製時間の制約から創傷や熱傷といった緊急時の対応に課題がある。そこで、先行研究において Polyglactin 910 メッシュを基材に複合化した凍結乾燥 PRP を考案し、長期保存可能な増殖因子供給源として、糖尿病モデルマウスの皮膚全層欠損における創傷被覆材料として有効であることを報告した。本研究では、polyglactin910 の分解成分は起炎性を持つことから、生体親和性の向上を目的として、複合化する基材をコラーゲンスポンジに変更し凍結乾燥 PRP の改良を試みた。以上のことから、本研究の目的は、一連の研究の成果からさらなる再生能を改善させようとするものであり、妥当性があり、かつ新規性が認められる。

その結果、凍結乾燥 PRP スポンジのコラーゲン線維の表面に多数の血小板付着と形成されたフィブリンメッシュを認めた。また、コラーゲン単独の場合と比較して水中で有意に低い粘弾性を示した。さらに、凍結乾燥 PRP スポンジには、凍結 PRP と同等の増殖因子 PDGF-BB, PDGF-AB, IGF-2, FGF4 などが保存されており、培地添加によりヒト骨膜細胞の増殖を促進した。骨膜細胞を播種した PRP スポンジはコラーゲン線維の間隙をフィブリンメッシュが覆い、未処理のコラーゲンスポンジと比較して培養 10 日後の細胞定着は僅少であった。ヌードマウス移植においては、肉眼的には PRP スポンジへ周囲から主要血管の侵入がみられた。組織学的には炎症性細胞の浸潤は軽微であり、PRP スポンジ周辺の組織に PCNA、 α SMA 陽性の細胞を多数認め、線維芽細胞の増殖と血管新生を示していた。さらに、未処理のコラーゲンスポンジに比べ、PRP スポンジ内部では早期に脂肪組織の形成が進んでいた。

これらの結果を導いた実験系をみると、ヒト末梢血から調製した PRP をコラーゲンスポンジとしてに室温で 3 分間含浸させ、凍結乾燥処理により PRP スポンジを作製した。4°C で 3 週間保存後、実験に供した。凍結乾燥前後の PRP スポンジに含まれる増殖因子は抗体アレイによって、表面性状と粘弾性はそれぞれ走査型電顕 (SEM) と原子間力顕微鏡により評価した。凍結サンプルと凍結乾燥サンプルの両者を比較検討することで、より客観性が得られたと考えられる。凍結乾燥 PRP スポンジがヒト培養骨膜細胞の増殖に及ぼす影響について、24well プレートに 10000 細胞を播種し、セルインサートにより PRP スポンジを添加し、3 日後の細胞数を WST-8 にて比色定量的に解析した。また、PRP スポンジにヒト骨膜細胞を播種し、2h, 16h 後の細胞形態を SEM により、24h 後の細胞増殖を組織標本により評価した。さらに、ヌードマウス背部皮下へ移植し、その組織修復への影響を免疫化学組織染色 (PCNA、 α SMA) によって検討した。骨膜細胞培養、NIR 色素による生体トレーサー実験、さらに背部皮下への移植実験と、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、PRP をコラーゲンスポンジと複合化して凍結乾燥することにより、生体親和性の向上、起炎性軽減を達成できた。さらに、凍結乾燥 PRP の生理活性を長期的に保存できることを示し、コラーゲンスポンジの三次元的構造が臨床的には緊急処置や軟組織再生療法における適応拡大につながることを示唆された。

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。