

〔原 著〕

ウサギ頭頂骨に設置したキャップ内の骨形成に対する Platelet-rich Plasma影響

川田 丈司, 廣瀬由紀人, 越智 守生, 賀来 亨*, 矢嶋 俊彦**

北海道医療大学歯学部歯科補綴学第二講座

*北海道医療大学歯学部口腔病理学講座

**北海道医療大学歯学部口腔解剖学第一講座

Effects of Platelet-rich Plasma on Bone Formation in a Cap placed on Rabbit Parietal Bone

Joji KAWADA, Yukiko HIROSE, Morio OCHI

Tohru KAKU*, Toshihiko YAJIMA**

Department of Fixed Prosthodontics

*Department of Oral Pathology

**First Department of Oral Anatomy

School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The aim of this study was to carry out a comparative assessment of the osteogenesis-promoting effects of platelet-rich plasma (PRP) in combination with different kinds of carrier compounds. An enclosed space was created by setting a cap on the rabbit parietal bone to study osteogenesis using the guided bone regeneration (GBR) method. The space was filled with PRP along with a bone-compensating carrier to induce osteogenesis, and the amount of osteoneogenesis in the cap was measured.

First, various methods for collecting PRP were assessed. Then a pair of polypropylene caps were attached to the surface of the parietal bone of each rabbit. One of these caps was filled with one of the following carriers : Collagen, β -TCP, thrombin· β -TCP complex, or sodium alginate (control group); the other cap was filled with the same carrier soaked with PRP (experimental group). After 8 weeks, undecalcified samples were sectioned and used for histological observations and measurements of the amount of osteoneogenesis. In addition, longitudinal observations of osteogenesis guided by the β -TCP·PRP complex were carried out.

The most suitable method for collecting PRP was found to be a double spin method (2400 rpm for 10 min followed by 3600 rpm for 15 min), yielding a platelet concentration factor of 13.5. The amount of osteoneogenesis in the cap was higher in the experimental PRP (+) group than in the control PRP (-) group.

受付：平成16年4月7日

with any of the carriers tested. The amount of osteogenesis was greater in the β -TCP·PRP complex pair than in any of the other carrier pairs. In the longitudinal study of osteogenesis using the β -TCP·PRP complex, PRP was found to increase osteogenesis relatively early in the experiment.

This experimental study supports the osteogenesis-promoting effects of the β -TCP·PRP complex without the combined use of thrombin, this suggests that the β -TCP·PRP complex alone will promote osteogenesis when used in clinical treatment. In addition, this method which uses no animal-derived thrombin, could have additional benefits in a clinical setting, preventing infection by unknown viruses or the side effects of abnormal blood coagulation.

Key words : PRP, Rabbit, Bone formation, β -TCP, GBR

緒 言

近年、歯科領域における顎骨補綴治療やインプラント治療において、骨形成能を最大限に賦活させるためには、間葉系細胞を骨芽細胞に分化、増殖させる成長因子とその組織環境が重要であることが明らかにされてきている¹⁾。また、一般に臨床で求められている骨再生法は、術者の技術に影響されない（確実性、操作性と管理性が高い）、安全性に優れている（非感染性で外科的侵襲や術後疼痛が少ない）手技、さらに実用性が高いシステムである。

わが国における自己血由来のPlatelet-rich plasma (PRP) の応用は、1990年代より皮膚科や整形外科領域で始まり、PRPは軟組織の創傷治癒に関する成長因子として注目されてきた^{2,3)}。一方、歯科領域においても、1998年にMarxら¹⁾による口腔・顎顔面外科領域における報告をはじめとして、PRPに関する臨床報告^{4~14)}は増加傾向にあり、PRPの高い実用性の確立が期待されている。しかし、PRPの骨再生作用と機能については未解明な部分も多く、研究方法や評価方法も不適切なものがあり、その有効性についても十分に明らかにされていない^{15,16)}。

PRPは骨再生^{17~21)}の4大要素の足場^{22,23)}、細胞¹⁸⁾、刺激^{24~26)}、成長因子^{27~29)}のうち、成長因

子（TGF- β , PDGF, IGFなど）を含み、同時に足場の働きも有するため（図1），骨の創傷治癒促進にその有効性が示唆されている³⁾。しかし、PRPの骨形成能を定量的に評価した報告はない。

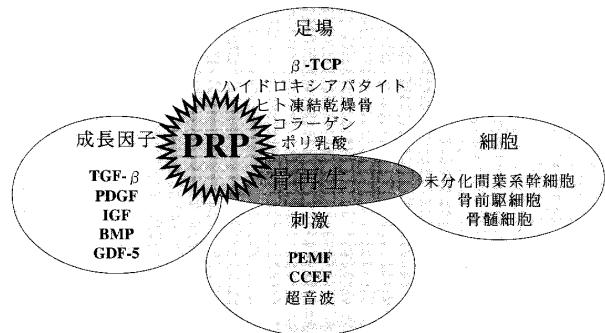


図1 骨再生の4大要素

そこで本研究では、ウサギ頭頂骨にキャップによる人工的な空間を作り、PRPが骨形成に及ぼす影響を新生骨量および組織像から比較検討した。同時にPRPの担体（コラーゲン、トロンビン・ β -TCP複合体、アルギン酸ナトリウム、 β -TCP）の影響も比較検討した。

材料および方法

1. PRPの採取法の検討

1) 実験動物

実験には、体重約2.5kgの日本白色ウサギ（ホクドー、札幌）20羽を用いた。ウサギは北海道医療大学動物実験センターにて検疫飼育

後、異常を認めなかつたものを実験に使用した。実験は「北海道医療大学動物実験の指針」に従い行った。

2) 採血法および遠心法

ウサギの後耳介静脈から採血針（インサイトN[®]翼なし24G14mm, Becton Dickinson, Salt Lake City, UT, U.S.A.）と真空採血管（ベノジェクトII[®]クエン酸ナトリウム3.8%含, テルモ, 東京）を用いて5ml採血をした後、遠心分離を行つた。遠心分離器はLabofuge300[®] (Heraeus, Germany) を使用した。

遠心法はシングルスピン法にて1200, 2400, 3600rpmで10分間回転を行つた。さらに、1200, 2400rpmにおいては、ダブルスピン法にて2回目の遠心回転を1200, 2400, 3600rpmとし15分間回転し、それぞれの血小板濃縮率を求めた。なお、予備実験の結果より本実験では、PRPの濃縮率を高めるために、採取方法を改良して行つた（図2）。

2. 血小板の活性化の検討

1) 血小板の活性化

血小板をトロンビン（0.5万単位、トロンビンモチダ[®], 持田製薬, 東京）1/10希釈にて3分間活性化させたものを血小板の形態におけるコントロールとした。血液を採取し、2%paraformaldehyde-2% glutaraldehydeで前固定後、1%OSO₄にて後固定した。固定終了後、通法に従い、アルコール系列で脱水、Epon-812樹脂にて包埋した。試料は、ガラスナイフにより、1μmの切片を作製し、トルイジンブルー染色を行い、光学顕微鏡により観察を行つた。超薄切片は、酢酸ウラン、およびクエン酸鉛にて染色を施した後、透過型電子顕微鏡³⁰⁾（TEM:JEM100CX[®], 日本電子）により観察と撮影を行つた。

同様に、走査型電子顕微鏡^{31,32)}（SEM: X-

650[®], 日立）にて観察と撮影を行つた。

3. 担体の差異によるPRPの骨形成の比較実験

1) 実験動物

動物は体重約2.5kgの日本白色ウサギ12羽を用いた。前投薬にジアゼパム（ホリゾン[®], 山之内製薬, 東京）2mg/kgの筋注と硫酸アトロピン（硫酸アトロピン注射液タナベ[®], 田辺製薬, 大阪）0.05mg/kgの皮下注を行つた後に、ペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル[®], 共立製薬, 東京）25mg/kgの後耳介静脈投与による全身麻酔下で実験を行つた。

2) 術式

頭頂部の剃毛後、塩酸リドカイン（キシレステシンA[®], 3Mエスペ, 東京）にて浸潤麻酔を行い、皮膚、骨膜を剥離して、頭頂骨の骨表面を露出させ、電気エンジン（インプランターII[®], 京セラ, 京都）を注水下で、低速回転にして（800rpm/min）トレフィンバーを用いて、直径5mm, 深さ1.5mmの溝を左右に2つ形成した。ラウンドバー#2を用いて、溝の内側に9つのドリルホールを設置後、直径5mm, 高さ8mmに加工したポリプロピレン製のキャップを被せた。その内部に血小板活性化作用があるアテロコラーゲン（テルダーミス[®], テルモ, 東京）、骨伝導性を有する多孔質β-TCP（オリンパス, 東京）、局所止血剤で血小板のα顆粒分泌効果を有するトロンビン^{33,34)}（ティーシール[®], バクスター, 東京）・β-TCP複合体、非動物性でトロンビンと同じ性質を持つアルギン酸ナトリウム³⁵⁾（アルト[®], カイゲン, 大阪）の担体を生理食塩水とともに充填した（対照群）。また、PRPは採取法の検討で濃縮率の良かつた条件のものを用いた。それぞれの担体・PRP複合体の群を充填した（実験群）。充填後、外科用接着材（アロンアルファA三共[®], 三共, 東京）にて骨面に固定し、骨膜、皮膚を

縫合した(図3)。

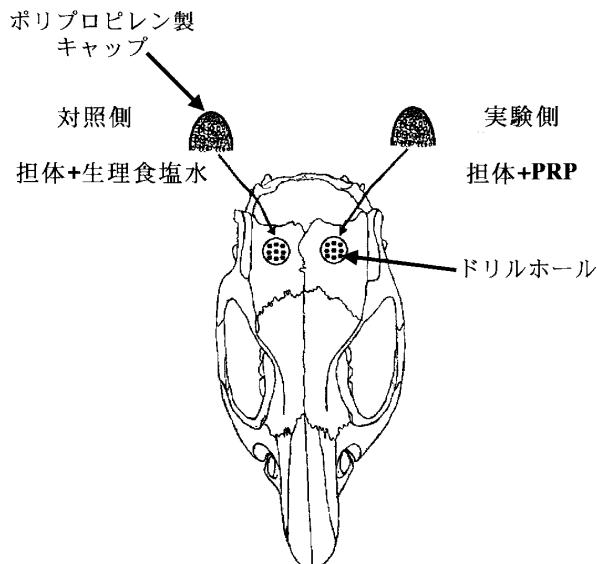


図3 ウサギ頭頂骨における担体埋入法

3) 組織固定

実験期間は8週とし、屠殺後に10%ホルマリン溶液による灌流固定を行った。頭頂骨を摘出し、10%ホルマリンにて浸漬固定、脱水後、通常法に従い、polyester resin (Rigolac®, 応研商事、東京) にて包埋し、薄切機 (BS3000®, Exakt, Germany) にてキャップ正中面で試料を薄切後、機械研磨機 (MG4000®, Exakt, Germany) で非脱灰研磨標本を作製した。

4) 骨形成量の評価法

塩基性フクシン・メチレンブルー重染色による組織観察と骨形成量を画像解析ソフト (NIH Image®1.62, National Institutes of Health, Bethesda, MD, U.S.A.) を用いた。統計処理には、計測により得られた値から各実験群の平均値を算出し、一元配置分散分析を行いFisherのPLSDによる多重比較検定法を用いた。有意水準は5%とした。

4. PRP-β-TCP複合体群の骨形成過程の分析

予備実験より骨形成量が最大であったPRP-β-TCP複合体群については、4, 8, 12, 16

週の長期経過観察を行った。

結 果

1. PRPの採取法の検討

1) シングルスピン法による血小板濃縮率

全血に対する血小板の濃縮率(平均値)では、シングルスピン法の平均濃縮率は、1200 rpmで10分遠心回転時、1.9倍、2400rpmで10分時、1.8倍、そして3600rpmで10分時、1.4倍であった(表1)。

表1 シングルスピン法によるPRP濃縮率

回転数	時間 分	遠心効果 $\times 10^4 \text{G.sec}$	濃縮率
1200	10	13	1.9±0.29
2400	10	54	1.8±0.23
3600	10	121	1.4±0.29
平均±標準偏差			

1200と2400rpmの遠心分離で同程度の血小板濃縮率が得られた。しかし、1200rpmにおいて、血球成分と血漿成分を明確に分画することができないため、血球成分が多量に混じる結果となった。一方で、2400rpm以上であると、明確に分離でき、また、2400と3600rpmとを比較すると、3600rpmの濃縮率が、低い結果となつた。以上より、ファストスピンの最適な回転数は、2400rpmであった。

2) ダブルスピン法による血小板濃縮率

ダブルスピン法によるテクニカルエラーとして、血液や分離した血漿を採取時に必要以上に強い力で吸引すると、血小板がその機械的刺激により活性化を起こした。吸引刺激により血小板の脱颗粒が起こり、血小板内に含まれる成長因子が細胞外に放出され、血液凝固を起こりやすくした。

ダブルスピン法では、シングルスピン法で、

良結果を得た1200, 2400rpmをファストスピンに設定し、セカンドスピンを1200, 2400, 3600 rpmにて行った。その結果、2400rpmで10分遠心回転した後、2400rpmで15分遠心回転時の条件と、2400rpmで10分遠心回転した後、3600 rpmで15分遠心回転時の条件で高濃縮され、血小板濃縮率は13.5倍となった（表2）。ダブルスピン法でもファストスピンを1200rpmで行うと、血球と血漿の分離が完全でないため、血小板の濃縮において差異が生じて、不適切であった。

表2 ダブルスピン法によるPRP濃縮率

	1回目 時間10分	2回目 時間15分		
回転数	遠心効果 ×10 ⁴ G.sec	回転数	遠心効果 ×10 ⁴ G.sec	濃縮率
1200	13	1200	20	5.5±3.1
1200	13	2400	81	6.8±6.7
1200	13	3600	183	5.3±5.3
2400	54	1200	20	10.7±2.6
2400	54	2400	81	13.5±4.9
2400	54	3600	183	13.5±4.8

平均±標準偏差

2. 血小板の活性化の検討

1) TEM像

血小板の活性化の状態をTEMで観察した（図4 a, b, c）。活性化の初期では、血小板中に含まれているα顆粒は血小板全体に散在しており、偽足形成を始めていた（図4 a）。中期では、α顆粒は血小板の中央部に集まり、多数の偽足を出していた（図4 b）。活性化の後期では、血小板の内部からα顆粒は消失していた。血小板からさらに多数の偽足が伸長し、星状を呈していた（図4 c）。

2) SEM像

血小板のSEM像では、それぞれの遠心回転条件における血小板の活性化を示す偽足が観察された。回転数が高くなるに従い、血小板の形態も橢円形から、長く太い偽足を多数伸ばして

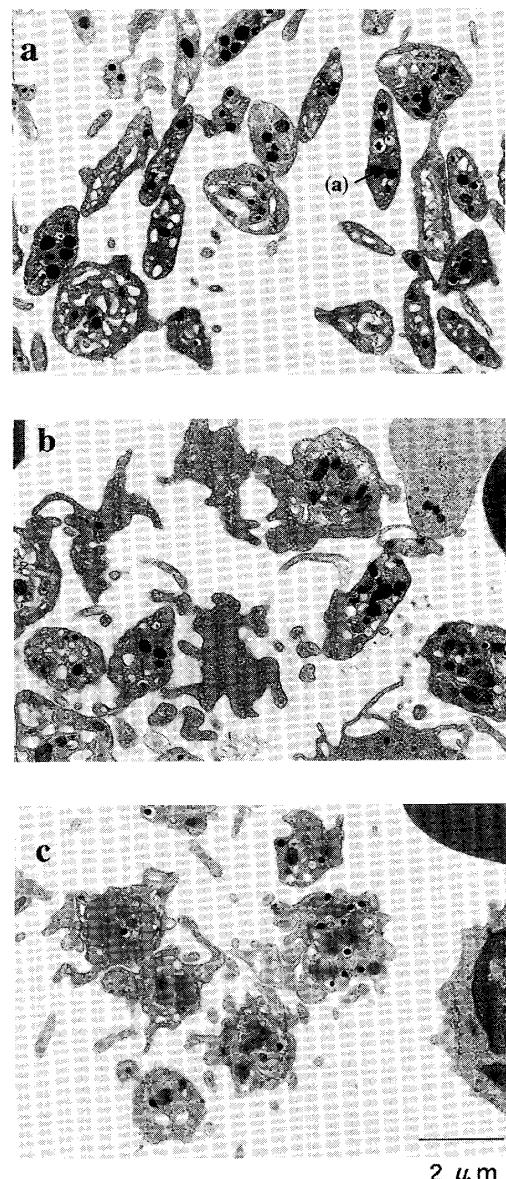


図4 血小板の活性化 (TEM像)

- a : 初期
α顆粒 (a) は血小板全体に散在し、形態的には偽足を出し始めている。
- b : 中期
α顆粒は血小板の中央に集まり、偽足の数も増えている。
- c : 後期
α顆粒は血小板から放出されかなり消失している。偽足が伸長し、星状を呈している。

いる星状の形態へ変化していた（図5）。

ダブルスピン法における1回目：2400rpm×10分、2回目：3600rpm×15分のSEM像は、トロンビンに反応させたSEM像と類似した形態であった（図5 a,c）。1回目：2400rpm×10

分、2回目：3600rpm×15分とトロンビンを併用したものは、トロンビンを併用しないものと比べると、さらに活性化作用が進み、フィブリソーム網を形成していた（図5c,d）。

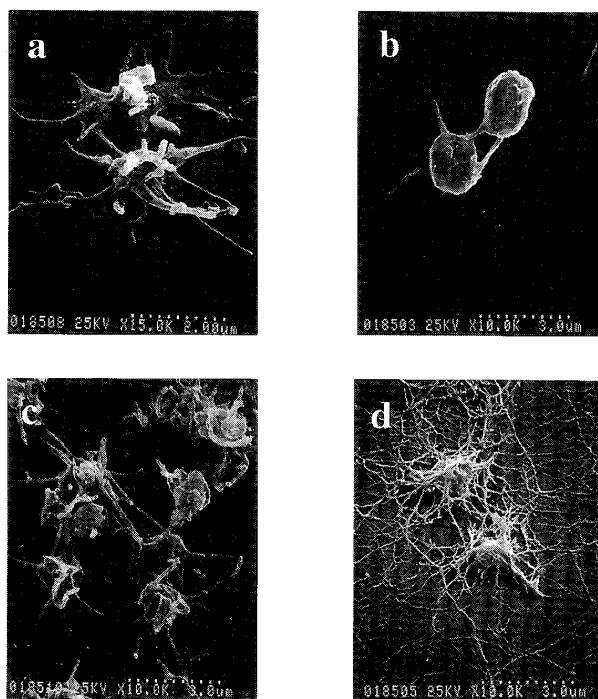


図5 血小板の活性化 (SEM)

- a : コントロール
全血にトロンビンを添加したもの
- b : 1回目：2400回転×10分、2回目：1200回転×15分
楕円形の形態から偽足を出し始めている
- c : 1回目：2400回転×10分、2回目：3600回転×15分
太い偽足が多数伸長して星状を呈している
- d : 1回目：2400回転×10分、2回目：3600回転×15分
+トロンビンフィブリソーム網を形成している

3. 担体の差異によるPRPの骨形成の比較実験

実験部位において、キャップ埋入周囲の腫脹や、膿瘍の形成、キャップ自体の露出は認められなかった。また、キャップの摘出時において、ポリプロピレン製のキャップは頭頂骨上に固定されていた。

PRPの採取法の実験結果より、ダブルスピンドル法の1回目：2400rpm×10分、2回目：3600rpm×15分で採取したPRPを骨形成実験に用了。

1) コラーゲン群

コラーゲン群では、PRP (+) がPRP (-) に比べて、キャップ内の広い範囲にわたって骨の形成が認められ、骨の形成量も多く認められた。PRP (+), PRP (-) ともに、既存骨と類似する染色の新生骨組織が認められ、新生骨組織は既存骨と連続していた（図6a,b）。

2) β-TCP群

β-TCP群において、PRP (+) では、既存骨と類似する染色の新生骨組織が、β-TCPの粒子の周囲に観察された。キャップ内の基底部である頭頂骨の近位部位では、遠位部位と比べて、広範囲でのβ-TCP吸収像が観察された。PRP (+) において、新生骨組織はキャップの先端付近まで、PRP (-) はキャップ中間付近まで観察され、PRP (+), PRP (-) ともに新生骨組織は既存骨と連続しており、キャップの周縁に沿って、骨の形成が認められた（図6c,d）。

3) トロンビン・β-TCP複合体群およびアルギン酸ナトリウム群

トロンビン・β-TCP複合体群とアルギン酸ナトリウム群では、PRP (+), PRP (-) とともに、骨形成はほとんど認められなかった（図7a,b,c,d）。

4) 新生骨量の画像解析

既存骨と新生骨の境界はキャップ内縁の最下端を結ぶ仮想直線とし、画像処理ソフトNIH Image[®]に読み込んで計測し、キャップ正中断面積における新生骨量の割合を算出した（図8）。結果は、コラーゲン群のPRP (-) は10.3%，コラーゲン群のPRP (+) は15.3%であった。β-TCP群のPRP (-) は21.4%，β-TCP群のPRP (+) は28.5%であった。アルギン酸ナトリウム群、トロンビン・β-TCP複合体群においては、PRP (+)(-) ともに5%未

満であった。どの担体もPRP(+)が、PRP(−)より骨の形成量は多い結果となった。担体別では、 β -TCPの骨形成量が最も多く、その他の担体と比べて、有意差が認められた(図8)。

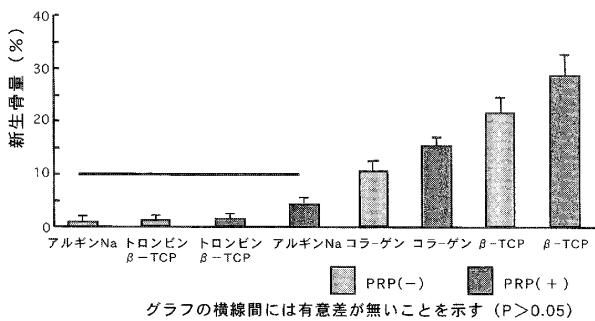


図8 新生骨形成量(キャップ正中断面における新生骨組織の割合)
担体別では β -TCPの骨形成量が最も多く、その他の担体と比べて有意差が認められる。(Fisher's PLSD)

4. PRP・ β -TCP複合体群の骨形成過程の分析

骨形成量が最大であった担体 β -TCP群埋入後4, 8, 12, 16週の摘出試料を、塩基性フクシン・メチレンブルー重染色後組織観察し、それぞれの骨形成量を画像解析した。

1) 4週の組織像

4週の組織像において、PRP(+)(-)とともに、新生骨はキャップ中間部付近まで観察された。PRP(+)は(-)と比べて、新生骨量は多く認められた。また、キャップ内縁に沿って、骨の形成が認められた(図9a,b)。

2) 8週の組織像

8週の組織像において、新生骨の多くは β -TCP顆粒の周囲に認められた。また、頭頂骨表面に近位部位が、遠位部位と比べて、多くの β -TCPが吸収されていた。PRP(+)の新生骨はキャップの先端付近まで、PRP(−)の新生骨はキャップの中間部付近まで観察された(図9c,d)。

3) 12週の組織像

12週の組織像において、PRP(+)(-)とともに β -TCPの吸収が認められた。特に、頭頂骨

に近いキャップ基底部が、先端部と比べて、多くの β -TCPが吸収されていた。しかし先端部の顆粒径が大きい β -TCPは、ほとんど吸収されていなかった。また新生骨量では、PRP(+)(-)の形成量の差は認められなかった(図10a,b)。

4) 16週の組織像

16週の組織像において、PRP(+)(-)の新生骨量の差はほとんど認められなかった。また骨量は12週より減少していた。 β -TCPの顆粒吸収量は観察期間で最大であった(図10c,d)。

5) 画像解析

正中断面積による4, 8, 12, 16週の新生骨量の変化は、4週において、PRP(−)11.6%, PRP(+)18.8%であった。8週において、PRP(−)21.4%, PRP(+)28.5%であった。12週において、PRP(−)16.4%, PRP(+)17.4%であった。16週において、PRP(−)15.4%, PRP(+)15.6%であった(図11)。

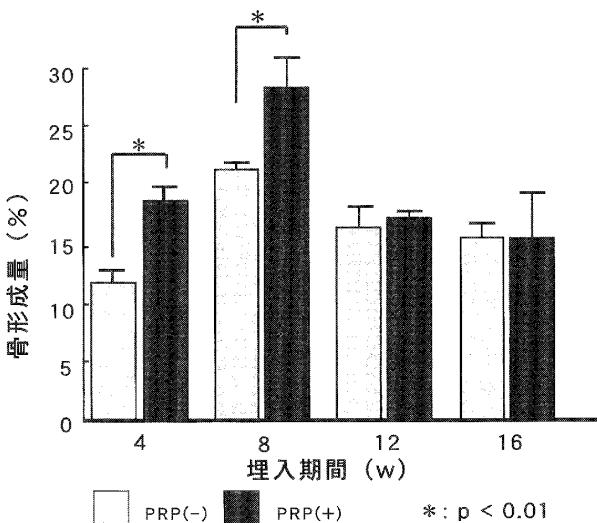


図11 骨形成量の変化(正中断面積による4, 8, 12, 16週の骨形成量)
PRP(−)(+)ともに8週の時、最大の骨形成量を示している。12週以降、骨量が減少し、16週ではPRP(−)(+)の差はない。(Fisher's PLSD)

以上結果よりPRP(+)(-)とともに新生骨の増加率は4週から8週の時が高く、8週時に最大の骨形成量を示していた。また12週以降は、

骨量の減少が認められた。16週では、PRP(+)(-)ともに骨量がほぼ同じ数値になった。

考 察

1. PRPの分離法について

PRPの分離法には、シングルスピinn法とダブルスピinn法がある。シングルスピinnにおいて、2400rpm以上の回転数を用いれば、血球と血漿を明確に分画することが可能となり、血小板の豊富な部位が明示され、効率的に血小板を採取することができるようになった。特に、Sonnleitnerら³⁶⁾の報告にもあるように、血清と血球との境界部分には白血球および血小板が大量に存在し、血球部分では境界から下へ数mmまでの部分に新鮮で幼若な血小板が大量に存在している。この部分を採取することで、通法³⁵⁾よりも高濃度のPRPを精製することが可能となった。また、ダブルスピinn法においては、セカンドスピinnが2400rpm以上で血小板の濃度はほぼ一定になることが示唆された。このことより、血小板濃度を上げるために、血小板自体にダメージを与えるほどの高回転数で、分離する必要はないと考えられた。最適遠心分離法の回転条件は、澤ら³⁷⁾によると、2400rpmで7分間遠心回転した後、3000rpmで10分間の遠心回転をするダブルスピinn法では、平均濃縮率は4.9倍であった。一般に、遠心分離器の性能の違いにより、回転数と時間だけで、単純に比較することができない。しかし、本実験では、血小板の採取部位の改善と、2400rpmで10分遠心回転したのち、3600rpmにて15分の遠心回転を行う条件より、澤ら³⁷⁾の実験の遠心効率(141×10^4 G·sec)よりも大きく(237×10^4 G·sec)，平均濃縮率も13.5倍となった。従って本法は濃縮するのに大変有用だと思われた。

2. 血小板の機能、血小板の活性化と形態の関係について

血小板自体の機能には、1)毛細血管透過性の抑制、2)血小板の粘着と凝集、3)血液凝固の促進、4)血餅の収縮、5)線維素溶解の抑制、6)血管の収縮、7)成長因子の貯蔵がある。2)の作用より、血小板は損傷を受けた血管内皮下に粘着し始める。そして、血小板が偽足を生じ、血小板同士の凝集を招く。そこに、血小板膜のリン脂質から生成されたトロンボキサンA2や動員されたCaイオンが加わると顆粒内容の放出が起り、血小板脱顆粒の状態になり、成長因子を放出し、軟組織創傷治癒を行うといわれている³⁸⁾。また、トロンビンなどの血小板の活性化物質や機械刺激により、血小板に含まれているα顆粒が、収縮タンパク質の作用により、微小管に取り囲まれるように、血小板の中心に集合する。α顆粒が開放小管系の膜に接触後、この膜とα顆粒の膜が融合し、顆粒の内容物(成長因子など)が開放小管系に放出され、さらに、周囲の環境へ拡散する(脱顆粒状態)。その際に活性化された血小板は、偽足を形成しつつ伸展する。本実験でも、SEMおよびTEM像において、それらが観察された。トロンビンによる刺激と、遠心回転の機械刺激による血小板の形態の違いは認められなかったが、遠心回転数の刺激の差による血小板の形態の違いが認められた。したがって、遠心回転数の条件を考慮する必要があると思われた。また、高回転の機械刺激とトロンビンの併用に関しては、血小板の活性化に対して、過剰な刺激になりうるので、トロンビンとの併用には注意が必要であると思われた。

3. 血小板の活性化について

SEMにて、遠心回転による血小板の形態の違いを観察した結果、高遠心回転血小板の形態は、全血にトロンビンを暴露させた血小板の形

態とほぼ同様であった。血小板は遠心分離過程の回転数による機械的刺激で活性化状態になることが推察された。血小板は、高濃縮と高遠心回転数により、血小板同士が接触する機会が増えることで、O'BrienとWoodhouseが報告³⁸⁾しているように、血小板の接触刺激により、活性化しやすくなると思われる。

β -TCP・PRP複合体は新生骨形成が優れていたのに対し、 β -TCP・PRP複合体にトロンビンを混合して血小板を活性化した実験群では、骨形成は見られなかった。トロンビンを使用した場合、さらに、反応が進み、フィブリン網を形成しキャップ内への細胞侵入を妨げると、成長因子をごく初期に放出しその制御が働くため、骨形成には不利に働くと思われた。

トロンビンの単位は、臨床で使用する際に10数秒でゲル状になるトロンビン単位(500単位/ml)を用いた。またトロンビンと同様の性質を持つ植物由来のアルギン酸ナトリウムにおいても、骨形成は認められなかった。アルギン酸ナトリウムは、生体内での分解性が低く、組織内で被包化されやすいため、血液や体液の流れが抑制され、骨形成を遅延させるとの報告³⁹⁾がある。担体としてアルギン酸ナトリウムは完全に吸収され、既存骨によって置換されることがないため、臨床応用するには問題があるようと思われた。

4. 骨形成量の評価方法について

骨形成能を検討するため、ウサギ頭頂骨の平坦な骨面を用い、GBRの原理に基づき、細胞毒性の無い、血小板に対して非活性化材質⁴⁰⁾であり、オートクレーブ滅菌が可能であるポリプロピレン製のキャップを利用した。また確実なスペースメーキングによる遮断効果および封鎖性を図り、内部に新生する骨量の客観的評価を行えるように、容積を0.1ccに規格化した。一

定範囲内の新生骨形成状態を正中断面積に求めることで定量的、客観的に評価することが可能となった。

5. PRP・ β -TCP複合体について

1) β -TCPについて

現在、骨補填材として自家骨以上に優れた生体材料は、まだ開発されていない。しかし、自家骨は採取にあたり、患者の外科的侵襲や術後の疼痛など問題点がある。一方、代用骨である β -TCPは骨形成能に劣るが、分子式 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ のリン酸カルシウム化合物で、水に対する溶解度は、ハイドロキシアパタイトに次いで小さいが⁴¹⁾、生体内において吸収・置換ができる材料である。また β -TCPは、骨伝導能を有しており²³⁾、生体材料として優れている。CaとPを成分とした人工物の β -TCPは安全性の問題からも優れていると思われる。

今回、コラーゲンと比較して、 β -TCPの骨形成量が多かった理由として、血清中のタンパク質を吸着する働きがあるため⁴¹⁾、担体としてPRPの保持効果が高かった点と、骨形成の際に必要なCaとPが、 β -TCPの溶解により、周囲に豊富にあった点が挙げられる⁴²⁾。本来、骨が存在しない部位に骨を形成させる過程では、目的とする部位に骨芽細胞前駆細胞および、骨芽細胞を分化、誘導し、同部位での骨芽細胞の活性化が不可欠だと考えられている。高濃度のカルシウムイオンが、骨芽細胞のアルカリホスファターゼ活性や、オスティオカルシン産生量を増加させることから、カルシウムイオンが骨芽細胞の分化を促進する^{43,44)}。織井の報告⁴⁵⁾によると、局所的にカルシウム濃度が上昇するに従い、細胞が活性化され、さらに、石灰化物の形成が促進される。これらのことより、局所の骨形成には、高濃度のカルシウムイオンの存在が重要であると思われる。

粒径については、125μm以下の大きさになる

と異物巨細胞により埋入早期に吸収され、骨形成のための場の確保ができなくなる⁴⁶⁾。また、粒子間隔が小さすぎると新生血管が侵入しにくいうだけでなく、骨形成に関与する細胞の侵入も妨げる。逆に、間隔が大きすぎると血餅の保持が難しくなる。これらの理由から、500μm前後が推奨されており⁴⁶⁾、今回、このサイズの粒径を用いた。

2) PRPについて

自己血から作られるPRPには、PDGF、TGF- β 1、TGF- β 2、IGF、EGF、ECGFなどの様々な成長因子が含まれている。その中のPDGFは、血管形成、細胞増殖などにより、創傷治癒に多くの有用性がみられ、血管新生やコラーゲン合成により骨再生が促進される。TGF- β 1、TGF- β 2は、骨芽細胞前駆細胞の走化性、有糸分裂を高め、骨形成を促進させ、また、破骨細胞の形成や骨の吸収を抑えることで骨形成を助長している³⁾。また、IGFは骨芽細胞の分裂、増殖を促進させ、骨形成時に骨添加を促進させる⁴⁾。これらの成長因子は他の成長因子とともに作用し、その結果として様々な経路で異なったシグナル伝達を行い、最終的には遺伝子発現を活性化してタンパク産生を行うようになる。そして、血漿中に含まれるフィブロネクチン、ビトロネクチンおよびフィブリリンもまた、細胞の分化、走化性に作用している。PRPの特徴は、1つの再生系路しかない合成された増殖因子の作用と異なっていることである⁴⁶⁾。

今回、 β -TCP・PRP複合体の骨形成量が一番多いという結果が得られたのは、これら β -TCPとPRPの利点によるものと考えられる。

3) 新生骨形成量について

β -TCP・PRP複合体は、4週において18.8%の骨形成がみられ、 β -TCP単体のもの

が、11.6%であったのと比べると、(62%増)骨量が多かった。16週では、 β -TCP・PRP複合体と β -TCP単体の骨形成量の差がなくなつたことから、PRPの骨形成効果は初期にあらわれることが分かった。このことは、PRPに含まれる成長因子の働く時期とも一致する¹⁾。また、16週においてキャップ内の骨が吸収しているのは、新生骨が頭頂骨の外側に過剰に形成されたものであるため機能しておらず、それが原因で吸収されたと思われる。

結論

PRPの骨形成を目的として、体重約2.5kgのウサギから採血をして、血小板の高濃縮について検討した。SEMにて血小板の活性化の様子を観察後、ウサギ頭頂骨にGBRの原理によるキャップの骨形成実験モデルを作製した。キャップ内に担体であるアテロコラーゲン、 β -TCP、アルギン酸ナトリウム、トロンビン・ β -TCP複合体を埋入した対照群と、これらの担体とPRPとの複合体を埋入した実験群において、キャップ内の骨形成量を比較検討した。その後、骨形成が良好であったPRP・ β -TCP群の骨形成過程を観察し、次の結果を得た。

1. 動物由来のトロンビンを使用しない本方法は、未知のウィルスの感染や、血液凝固異常を予防することができるため有用であると思われた。
2. ダブルスピinn法にトロンビンを併用すると、血小板の活性化がさらに進み、フィブリソーム網を形成して凝固し、細胞などの侵入を妨げ、骨形成には不利に働くと推測された。
3. コラーゲン、 β -TCP、トロンビン・ β -TCP複合体、アルギン酸ナトリウムを担体として用いた場合、PRP (+) 群は、PRP (-) 群と比べて、キャップ内部の骨形成量は多かった。

4. PRP・β-TCP複合体が、新生骨量が一番多かったのは、β-TCPが他の担体よりCaやPの供給が多いため、速やかに骨形成が行われていたためと推測された。
5. PRP・β-TCP複合体による骨形成は実験初期に顕著に認められたので、PRPの骨形成効果は初期にあらわれると推測された。

以上より、PRPの骨形成促進効果が動物実験で確認されたことより、臨床においても、生体材料とPRPのみで骨形成が促進されることが示唆された。また、歯科領域のインプラント治療などの小手術においてGBRの応用とPRP・β-TCP複合体を使用した場合、PRPは骨成長因子を含んでおり、骨形成に有効であると考えられた。PRPは骨形成の場を確保する生体材料として優れていることが示唆され、治療期間の短縮化と従来の移植材料の問題点を解決する可能性があると考えられる。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なる御指導と御高闇を賜りました、北海道医療大学名誉教授坂口邦彦先生に深謝致します。さらに、終始暖かい御支援と御協力を頂きました本学歯学部歯科補綴学第二講座、口腔病理学講座、口腔解剖学第一講座の諸先生、歯学部ハイテクリサーチセンター電子顕微鏡機器室 伊藤亜男氏および動物実験センターの皆様に心から御礼申し上げます。

本論文の一部は、東日本歯学会第20回学術大会（2002年2月、札幌）、日本補綴歯科学会東北・北海道支部学会（2002年8月、札幌）、東日本歯学会第21回学術大会（2003年2月、札幌）、第109回日本補綴歯科学会（2003年5月、東京）、および第33回日本口腔インプラント学会（2003年7月、名古屋）において発表した。

また、本研究の一部は平成14、15年度日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究C（2）、課題番号14571855）により行った。

文 献

1. Marx ER, Carlson RE, Eichstaedt MR, Schimmele RS, Strauss EJ, Georgeff RK : Platelet-rich plasma : growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **85** : 638–646, 1998.
2. Pierce GF, Tarplin JE, Yanagihara D, Mustoe TA, Fox GM, Thomason A : Platelet-derived growth factor(BB homodimer), transforming growth factor-β1, and basic fibroblast growth factor in dermal wound healing. Neovessel and matrix formation and cessation of repair. *Am J Pathol* **140** : 1375–1388, 1992.
3. Philippart P, Brasseur M, Hoyaux D, Pochet R : Human recombinant tissue factor, platelet-rich plasma, and tetracycline induce a high-quality human bone graft : a 5-year survey. *Int J Oral Maxillofac Impl* **18** : 411–416, 2003.
4. Lynch SE, Buser D, Hernandez RA, Weber HP, Stich H, Fox C H, Williams RC : Effects of the platelet-derived growth factor/insulin like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental implants. Results of a pilot study in beagle dogs. *J Periodontol* **62** : 710–716, 1991.
5. Whitman DH, Berry RL, Green DM : Platelet gel : an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* **55** : 1294–1299, 1997.
6. Anitua E FPlasma rich in growth factors : preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Impl* **14** : 529–535, 1999.
7. 澤 裕一郎, 川野 大, 福井克仁, 他：自己血からの多血小板血漿（PRP：Platelet rich plasma）を用いた上顎前歯部自家骨移植の1例－インプラント治療における骨移植への有用性－. 日口外誌 **46** : 372–374, 2000.
8. 澤 裕一郎, 望月 誠：PRPによる自家骨移植についての臨床的検討－インプラント治療における骨移植への有用性－. 日口腔インプラント誌 **14** : 279–286, 2001.
9. Lekovic V, Camargo PM, Weinlaender M, Vasilic N, Kenney EB : Comparison of platelet-rich plasma, bovine

- porous bone mineral, and guided tissue regeneration versus platelet-rich plasma and bovine porous bone mineral in the treatment of intrabony defects : a reentry study. *J Periodontol* **73** : 198–205, 2002.
10. Fennis JPM, Stoelinga PJW, Jansen JA : Mandibular reconstruction : a clinical and radiographic animal study on the use of autogenous scaffolds and platelet-rich plasma. *Int J Oral Maxillofac Surg* **31** : 281–286, 2002.
 11. Wiltfang J, Schlegel KA, Schultze-Mosgau S, Nkenke E, Zimmermann R, Kessler P : Sinus floor augmentation with β -tricalcium phosphate (β -TCP) : does platelet-rich plasma promote its osseous integration and degradation ? *Clin Oral Impl Res* **14** : 213–218, 2003.
 12. Zechner W, Tangl S, Tepper G, Fürst G, Bernhart T, Haas R, Mailath G, Watzek G : Influence of platelet-rich plasma on osseous healing of dental implant : a histologic and histomorphometric study in minipigs. *Int J Oral Maxillofac Impl* **18** : 15–22, 2003.
 13. 竹腰利英 : インプラント周囲骨欠損に対する多血小板血漿の骨再生促進効果に関する実験的研究, 広大歯誌 **35** : 33–48, 2003.
 14. Choi BH, Im CJ, Huh JY, Suh JJ, Lee SH : Effect of platelet-rich plasma on bone regeneration in autogenous bone graft. *Int J Oral Maxillofac Surg* **33** : 56–59, 2004.
 15. Landesberg R, Moses M, Karpatkin M : Risks of using platelet rich plasma gel. *J Oral Maxillofac Surg* **56** : 1116–1117, 1998.
 16. Sánchez RA, Sheridan JP, Kupp IL : Is platelet-rich plasma the perfect enhancement factor? A current review. *Int J Oral Maxillofac Impl* **18** : 93–103, 2003.
 17. 田畠泰彦 : ティッシュエンジニアリングー組織再生誘導のための基盤技術開発ー. 最新医学 **58** : 49–56, 2003.
 18. Yamada Y, Boo JS, Ozawa R, Nagasaka T, Okazaki Y, Hata K, Ueda M : Bone regeneration following injection of mesenchymal stem cell and fibrin glue with a biodegradable scaffold. *J Craniomaxillofac Surg* **31** : 27–33, 2003.
 19. 笹 義人 : 再生医工学の過去・現状・未来. 遺伝 (別冊) **13** : 122–129, 2001.
 20. Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science* **260** : 920–926, 1993.
 21. 井上一知 : II. Tissue engineering 2. 再生医療への展望. 日外誌 **102** : 282–287, 2001.
 22. 西山令生, 杉山利子, 平井義人 : 組織再生誘導法における α -TCP顆粒添加コーゲンスponジの有用性. 日歯保存誌 **45** : 565–575, 2002.
 23. 夫才成, 日比野祥敬, 山田陽一, 新美 敦, 本田雅規, 岡崎恭宏, 畠 健一郎, 吉川隆章, 上田実 : 生体吸収性セラミックス β -TCPを足場に用いた培養人工骨に関する実験的研究. 日口外誌 **47** : 1–7, 2001.
 24. 井上四郎 : CCEF法による電気刺激法. *MB Orthop* **6** : 89–98, 1993.
 25. 松本弘幸, 坂口邦彦, 越智守生 : パルス電場刺激の家兎大腿骨インプラント埋入モデルへの応用. 第1報 磁場強度, 1日あたりの刺激時間の影響. 補綴誌 **40** : 1171–1182, 1996.
 26. 加々見寛行, 越智守生, 広瀬由紀人, 坂口邦彦, 賀来 亨 : 容量結合型電場刺激 (CCEF) 法の口腔インプラントへの応用ー家兎インプラント埋入モデルにおける骨形成促進効果の研究ー. 日口インプラント誌 **13** : 38–46, 2000.
 27. 川上敏行 : 骨形成因子 (BMP) と骨形成. 松本歯学 **25** : 101–112, 1999.
 28. 久保木芳徳, 滝田裕子, 小野一郎 : 骨形成蛋白質 (BMP) を応用した骨の組織工学の原理. 臨外 **56** : 61–74, 2001.
 29. 國安宏哉, 広瀬由紀人, 賀来 亨, 金子昌幸, 田隈泰信 : Growth differentiation factor-5 / β -TCP複合体によるビーグル犬前頭洞内骨形成に関する実験的研究. 東日本歯誌 **21** : 11–23, 2002.
 30. 寺尾 清 : 初学者のための透過電顕像の読み方. 南江堂, 東京, 1985. 116–117.
 31. 板倉 宰 : 血液凝固・線溶の基礎と走査電顕アト拉斯. メジカルビュー社, 東京, 1982. 144–153.
 32. 松本英彬, 小原明子, 林正好, 岡田徳弘 : ADP凝集による血小板粒度分布と走査電子顕微鏡を用いた血小板形態の検討. *Sysmex J* **5** : 12–17, 1982.
 33. 菊池白, 沖野由美, 児野喜穂 : 止血性接着剤・FKS-Zの臨床—出血性疾患における顎・口腔領域への応用ー. 口科誌 **34** : 166–181, 1985.
 34. 久保四郎, 山本悦秀, 橋 直哉, 小田島哲世, 小浜源郁, 黒川一郎 : フィブリン接着剤 (Tisseel[®]) の口腔外科領域への応用に関する基礎的ならびに臨床的検討, 第1報 : フィブリン接着剤のラット背部皮膚切創に対する創傷治癒効果. 日口外誌 **28** : 1577–1583, 1982.
 35. 澤 裕一郎, 德永有紀 : アルギン酸ナトリウムで処理したPRPを用いた自家骨移植について 一トロンビンの代用としてのアルギン酸ナトリウムの可能性ー. *QE* **21** : 1285–1290, 2002.

36. Sonnleitner D, Huemer P, Sullivan YD : A simplified technique for producing platelet-rich plasma and platelet concentrate for intraoral bone grafting techniques : a technical note. *Int J Oral Maxillofac Impl* **15** : 879 – 882, 2000.
37. 澤 裕一郎, 渡邊悟朗, 原禎幸, 丸山誠二, 桜田聰彦, 溝越俊二：少量の自己血からのPRP作製法に関する検討－8 mlの自己血からの1 mlのPRP作製法－. 日口インプラント誌 **15** : 59–65, 2002.
38. O'Brien JR, Woodhouse MA : Platelets : their size, shape and stickiness in vitro : degranulation and propinquity. *Exp Biol Med* **3** : 90 – 102, 1968.
39. 昆隆一, 荒木吉馬： α 型リン酸三カルシウム－キトサン系骨補填材の骨伝導性－アルギン酸塩被膜による窩洞封鎖効果－. 歯材器 **19** : 478 – 483, 2000.
40. 山根 進, 小田 亮, 樋口勝規, 下御領良二, 田中 悟, 松江正芳, 上野 徹, 中根高信：多血小板血漿（PRP）の精製法についての検討, 日口インプラント誌 **16** : 77 – 83, 2003.
41. 青木秀希：驚異の生物体質アパタイト. 医歯薬出版, 東京, 1999. 1 – 17, 87 – 122,
42. Khalid AAR : Bone graft substitutes : a comparative histologic review of osteoconductive grafting materials. *Int Oral Maxillofac Impl* **16** : 105 – 114, 2001.
43. Ozawa S, Kasugai S : Evaluation of implant materials (hydroxyapatite,glass-ceramics, titanium)in rat bone marrow stromal cell culture. *Biomaterials* **17** : 23 – 29, 1996
44. Matsuoka H, Akiyama H, Okada Y, : In vitro analysis of the stimulation of bone formation by highly bioactive apatite-and wollastonite-containing glass-ceramic : Released calcium ions promote osteogenic differentiation in osteoblastic ROS17/2.8 cells., *J Biomed Mater Res* **47** : 176 – 188, 1999.
45. 織井弘道：骨芽細胞様細胞の細胞増殖, 石灰化物形成および細胞外マトリックス成分の発現におよぼすカルシウムイオンの影響. 日大歯学 **73** : 558 – 566, 1999.
46. 山本浩正：骨移植材のお話. 一骨のバイオロジー PART IV－. QE19 : 161 – 171, 2000.

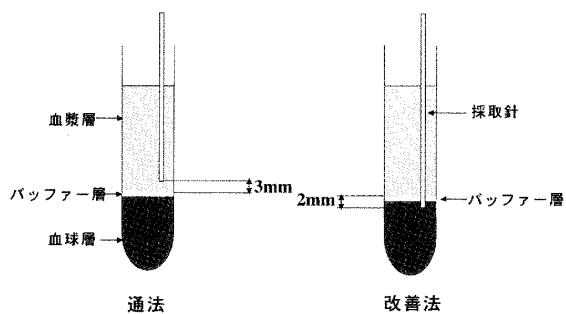


図2 ダブルスピinn法におけるファス
トスピnn後の血小板採取部位

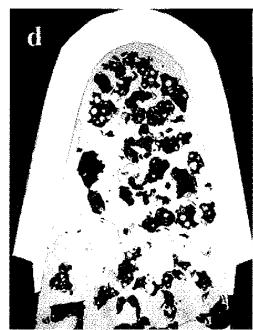
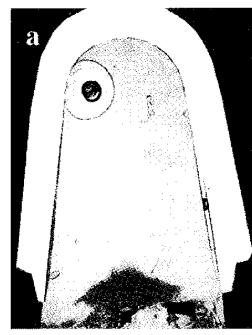
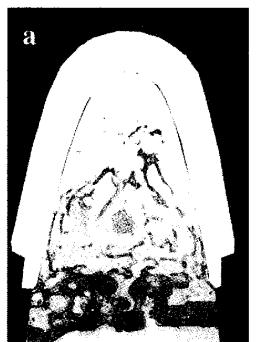


図6 コラーゲン群および β -TCP群の骨形成像、8週の組織像

a : コラーゲン・PRP (-) ($\times 20$)

b : コラーゲン・PRP (+) ($\times 20$)

c : β -TCP・PRP (-) ($\times 20$)

d : β -TCP・PRP (+) ($\times 20$)

a, b とともにキャップ内に、新生骨の形成が認められる。
bはaと比べて、キャップ内の広範囲に骨の形成が認められる。

cはキャップの中間付近まで、新生骨が観察される。

dはキャップ先端付近まで、新生骨が観察される。

図7 アルギン酸ナトリウム群およびトロンビン・ β -TCP複合体群の骨形成像、8週の組織像

a : アルギン酸ナトリウム・PRP (-) ($\times 20$)

b : アルギン酸ナトリウム・PRP (+) ($\times 20$)

c : トロンビン・PRP (-) ($\times 20$)

d : トロンビン・PRP (+) ($\times 20$)

a, b, c, d ともに骨形成はほとんど見られない。

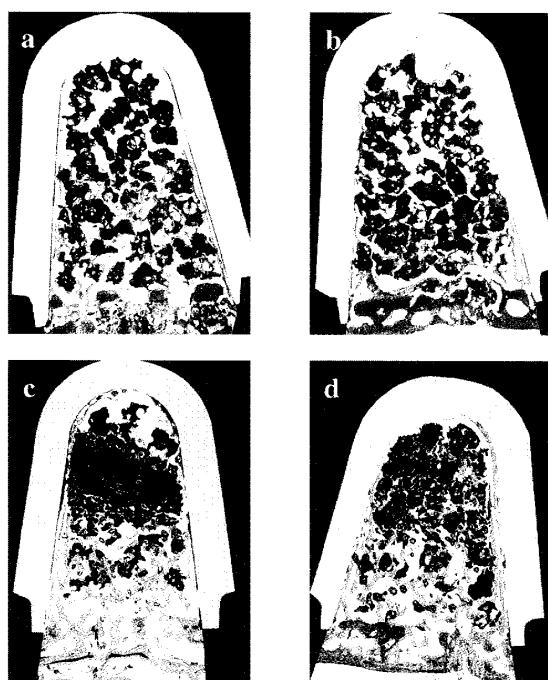


図9 β-TCP群の骨形成像. 4, 8週の組織像

a : β-TCP・PRP (-) 4週 ($\times 20$)b : β-TCP・PRP (+) 4週 ($\times 20$)c : β-TCP・PRP (-) 8週 ($\times 20$)d : β-TCP・PRP (+) 8週 ($\times 20$)

a,bとともに新生骨はキャップ中間部付近までに観察される。またキャップ内縁に沿って、骨の形成が認められる。c, dともβ-TCPの顆粒の周囲に骨形成が認められる。頭頂骨表面に近位部位が、遠位部位と比べて多くのβ-TCPが吸収されている。

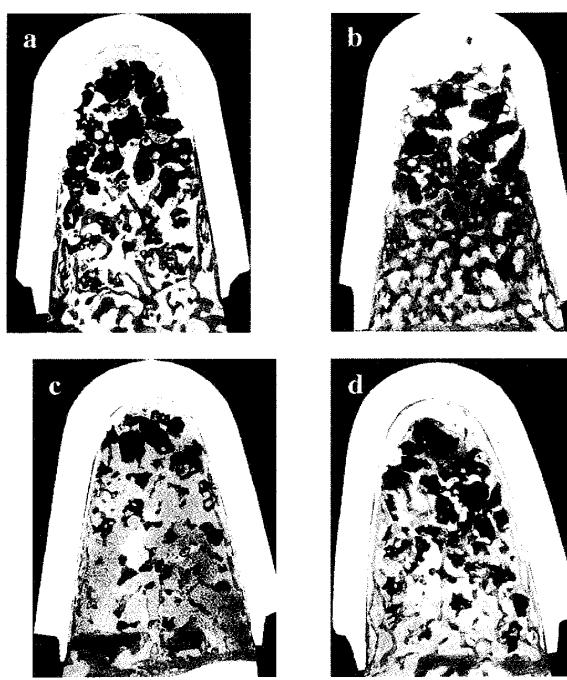


図10 β-TCP群の骨形成像. 12, 16週の組織像

a : β-TCP・PRP (-) 12週 ($\times 20$)b : β-TCP・PRP (+) 12週 ($\times 20$)c : β-TCP・PRP (-) 16週 ($\times 20$)d : β-TCP・PRP (+) 16週 ($\times 20$)

a, b, c, dともにキャップ基底部に近位部位のβ-TCPの吸収像が認められる。

新生骨量は、8週と比べると12, 16週とも減少している。