

氏 名	諏訪 吉 史
(ふりがな)	(すわ よしふみ)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲 第 号
学位審査年月日	平成 29 年 1 月 11 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Changes of vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor concentrations in platelet-rich plasma after preparation (濃厚血小板血漿 (PRP) 中に含まれる成長因子 VEGF と PDGF の経時的濃度変化)
論文審査委員	(主) 教授 上 田 晃 一 教授 河 田 了 教授 朝 日 通 雄

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 《背景と目的》

再生医療は、疾病や外傷による組織欠損のために機能と整容性を失った組織、臓器の再生をめざす医療であり、創薬への応用も期待されている。歯科医療における硬組織再生療法として、従来から自家骨あるいは人工骨の移植が臨床応用されてきた。良性腫瘍切除後や口腔インプラント埋入予定部位などの骨欠損部に対して、自家骨移植が最も安全であると報告されているが、健常部に侵襲を加えるなどのデメリットがあり臨床上問題になる場合がある。一方、人工骨にも、移植部の長期経過後の感染の可能性、骨誘導能がないため広範な欠損範囲では使用が困難となるといったデメリットがあり、理想的な骨再生材料の開発が求められている。

そうした中で、自己血から作製し、成長因子を豊富に含むとされる濃厚血小板血漿

Platelet-rich plasma (以下:PRP) が、硬組織や軟組織再生分野で注目されはじめている。しかし、PRP を用いた組織再生に関する症例報告は多く認めるが、実際に創傷治癒の促進に貢献している成長因子の濃度や、作製後の時間経過に伴ってどのように変化するかを検討した論文はきわめて少ない。

#### 《対象と方法》

研究参加に同意が得られた 25 歳から 32 歳までの健康な男女 17 名 (男性 10 名、女性 7 名、平均年齢 26.3 歳) より検体となる血液を採取し、専用遠心分離機 (モリタ 416G、Osaka、Japan) 1000G、2750rpm で 10 分間の遠心分離を行い PRP を作製した。遠心分離操作が終了した時をスタート点、すなわち 0 分後として、そこから 15 分後、30 分後、60 分後、120 分後、1440 分後の 5 つのポイントを経時的変化の観察点とした。各ポイントで採取した PRP 中の血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) および血小板由来増殖因子 (PDGF) の濃度を ELISA Kit (R&D Systems、Minneapolis、MN、USA) を用いて定量した。統計ソフトは Microsoft Excel 2008 および ystat2008 を使用し、有意差検定は一元配置分散分析法 (One-factor ANOVA) で群間比較を行った後、Bonferroni 法で多重比較検定を行った (有意差  $p<0.05$ )。

#### 《結果》

##### 1) VEGF

VEGF 濃度の平均値 (n=17) は、遠心分離操作終了後より 15 分後  $107.66 \pm 85.31 \text{pg/ml}$ 、30 分後  $97.33 \pm 79.30 \text{pg/ml}$ 、60 分後  $101.97 \pm 92.06 \text{pg/ml}$ 、120 分後  $103.42 \pm 80.52 \text{pg/ml}$ 、1440 分後  $161.07 \pm 180.11 \text{pg/ml}$  であり、時間経過とともに一定の濃度を保ち、その後増加する傾向がみられた。VEGF 濃度の平均値は、作製 15 分後と比較して 1440 分後で有意 ( $p<0.05$ ) に高かった。

##### 2) PDGF

PDGF 濃度の平均値 (n=17) は、遠心分離操作終了後より 15 分後  $6.70 \pm 5.77 \text{ng/ml}$ 、30

分後  $5.72 \pm 3.65 \text{ng/ml}$ 、60 分後  $5.57 \pm 3.01 \text{ng/ml}$ 、120 分後  $6.06 \pm 4.65 \text{ng/ml}$ 、1440 分後  $8.03 \pm 5.79 \text{ng/ml}$  であり、時間経過とともに一定の濃度を保ち、その後増加する傾向がみられた。PDGF 濃度の平均値は、15 分後と比較して 1440 分後で有意差は認めなかった。

#### 《考察》

1998 年に Marx らは、PRP に成長因子が多く含まれることに着目し、顎骨腫瘍切除後の骨欠損部に PRP と自家骨を混合して移植した。その結果、従来の自家骨単独移植と比較して、劇的に良好な結果が得られたことを世界で初めて報告した。以来、PRP を使用した臨床研究が再生医療において脚光を浴びるようになった。

今回我々は、被験者からの採血により PRP を単離し、PRP 中の成長因子 VEGF と PDGF の濃度が時間経過によってどのように変化するのかを解析した。その結果、VEGF および PDGF の濃度は PRP 作製後一定の濃度を保ち、24 時間後には増加傾向にあることが明らかになった。このことは、PRP 作製後 24 時間の間は VEGF および PDGF の効果が持続する事を示している。

臨床使用する場合、PRP 中に含まれる成長因子の濃度変化を理解して使用することは、きわめて重要である。過去に、成長因子の作製後の経時的濃度変化についての詳細な報告はなく、長時間手術などに使用する場合の PRP 使用効果は疑問視されていた。本研究では、PRP 中に含まれる成長因子の中で組織再生に最も重要な VEGF および PDGF の経時的濃度変化を明らかにし、その濃度が作製後 24 時間までは維持されることを明らかにした。

(様式 甲 6)

## 論文審査結果の要旨

再生医療は、手術や外傷などで喪失した組織を多分化幹細胞や成長因子を用いて再生する医療技術である。申請者は、濃厚血小板血漿 Platelet-rich plasma (以下：PRP) を用いた再生医療に着目して、PRP に含まれる成長因子である血管内皮細胞増殖因子 (以下：VEGF) および血小板由来増殖因子 (以下：PDGF) の作製後の経時的濃度変化を ELISA 法を用いて解析している。

臨床において、PRP を使用する領域は、整形外科、形成外科、歯科口腔外科など多岐にわたっている。また近年施行された再生医療等安全確保法にも PRP が第 3 種細胞加工物に指定されるなど、今後多くの医療分野で使用されていくことが想定される。

しかし、PRP 中に含まれる成長因子の濃度が作製後に時間経過に伴って減少するのか、増加するのかを詳細に解析した報告はない。

PRP を実際に手術で使用する際には、直接患部に注入する場合、自家骨移植後の縫合閉鎖直前に使用する場合、人工骨と混和して使用する場合など、様々な状況があり PRP 作製後に患者組織に入れるまでの時間には、術式により大きなばらつきがある。PRP 作製後、使用までに長時間が経過するような手術に適用することを想定すると、果たして PRP 中の成長因子が一定濃度維持されているのか否かを証明することは、PRP を効果的に使用するために不可欠である。

申請者は、本研究において PRP 中に含まれる成長因子 VEGF および PDGF の経時的濃度変化を測定し、PRP 作製後 24 時間まで維持され、さらに増加傾向にあることを明らかにした。本研究結果は、PRP を臨床医が使用する上できわめて重要な知見であると言える。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条 1 項に定めるところの博士 (医学) の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Journal of hard tissue biology 26(1): 33-36, 2017