



一般社団法人 東京形成歯科研究会

創立 35 周年記念

2017年度

会 報 誌

Tokyo Plastic Dental Society

発行年月日 平成30年3月5日



Contents

● プログラム・抄録集

2017 年度 第8回

再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会

● 2017 年 論文集

● 2016・2017 年度 活動報告



一般社団法人 東京形成歯科研究会





一般社団法人 東京形成歯科研究会

一般社団法人東京形成歯科研究会 2017 年度 会報誌

巻頭言	1
2017 年度 第 8 回「再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会」プログラム・抄録集	
挨拶 Greeting	3
祝辞 Congratulatory Speech	4・5
開催概要 Event Outline	6
会場(国際特別講演会) Contribution	7・8
スケジュール(国際特別講演会) Schedule	9～11
TPDS 35 周年記念パーティー Contribution (Dinner)	12
抄録 Abstract	13～22
企業展示案内 Guidance of the company display	23
出展企業問合せ先 Exhibition company reference	24
広告掲載 Insertion	25～30
一般社団法人 東京形成歯科研究会 2017 年 論文集	
・An Evaluation of the accuracy of the subtraction method used for determining platelet counts in advanced platelet-rich fibrin and concentrated growth factor preparations	31～41
・Platelet-rich fibrin prepared from stored whole-blood samples	42～48
・Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF)	49～54
・Quality Assessment of Platelet-Rich Fibrin-Like Matrix Prepared from Whole Blood Samples after Extended Storage	55～65
一般社団法人 東京形成歯科研究会 2016・2017 年度 活動報告	
挨拶 Greeting	67・68
JSOI「専修医」試験(2016 年度) 合格者の声 Voice of the passer	69
JSOI「ケースプレゼンテーション」試験(2016 年度) 合格者の声 Voice of the passer	70
TPDS 主催 JSOI 認定講習会(2016 年度) 受講者の声 Voice of the student attending a lecture	71
TPDS 主催 学術大会 Academic meeting hosted by TPDS	72
学会活動・海外 Society activity in foreign countries	73
TPDS 主催 研修施設セッション Conference Presentation	74
学会発表(口頭発表 及び ポスター発表) Conference Presentation	75～78
共同研究(TPDS×新潟大学) Cooperative Research	79・80
LIVE サージェリー／Hands On Live Surgery／Hands On	81～86
親睦会 Social gathering	87
“認定再生医療等委員会”認定 Authorization certificate	88
再生医療新法 施行 The enforcement of the law	
特定細胞加工物製造の届出／再生医療等提供計画の提出 “無菌操作区域＝クリーンベンチ”「PRP 等における操作 BOX」の案内	89・90
役員名簿 List of the officer	91

一般社団法人 東京形成歯科研究会 施設長・理事長／国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB） チェアマン

王子歯科美容外科クリニック 総院長 医学博士 奥寺 元



時代に即したイノベーションを追及する開業医の学術集団、梁山泊を目指して！！

日本の歯科におけるアカデミアンとしての現状を考えた場合に、第一に挙げられるのが大学の研究集団ではなかろうか？しかし、その実態は講座としての実績論文のみに徹して、学位のノルマだけの研究の為に研究に甘んじてはいないだろうか？はたまた講座再編成及び改変に際してその既得権を維持するために、時代に合わない講座が存在し、それが国家試験の出題に鑑みて受験生が何の為に学問追究か解らなくなっており、それが多くの国家試験浪人を生み、歯科社会に対応できない廃人を生むことに対して危機感を感じていない。この事は行政も歯科医師会も、われ関せずではないだろうか？この事にメスを入れるべき、歯科の現場から国民が望む医療学術を目標に、あらゆる方面で魅力ある歯科医療に提案し、そして夢のある学術集団が東京形成歯科研究会である。**大学の講座研究以上の活動の場として**、当研究会は今まで、数多くの学会にて研鑽を積んだ研究を発表し、議論を交わし、終末的に内外の学術誌に論文を投稿してきた。本紙にその実績を掲載している。その多くは、開業医にとって患者が求めている内容で現実味があるものばかりである。それは全て臨床の現場から生まれており、ここも大学の講座と違いがあり、低迷している講座より実績があると自負している。先の（公社）日本口腔インプラント学会の特別論文賞の受賞もこの延長上にある。



国際的交流の場をもとめた環境として、当研究会の活動の場は、日本の閉鎖的学閥社会を打破するために積極的に海外へ拠点を求めてきた。それは当時、国際口腔インプラント学会 ICOI から始まり、世界各地を飛びまわってその国の歯科事情や世界観でのインプラント臨床を求めてきた。世界最大のインプラント学会として究極的には段階を得てトップの会長座位に登りついた。インプラントの創世期が過ぎ、今は再生医学の歯科の一部分野に徹するべく、国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB）として各地を訪れていて牽引している。



2017 年度

第 8 回

「再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会」



一般社団法人 東京形成歯科研究会 (TPDS)



国際血液・幹細胞臨床応用会議 (ISBB)

一般社団法人 東京形成歯科研究会 会長

古谷田歯科医院 院長

古谷田 泰夫



2017年度 第8回 「再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会」 開催にあたり

2011年に横浜で国内外の多くの研究者並びに臨床家を集めて、国際血液生体材料臨床応用会議が行われたのが、つい先日のように思える。顎骨再生は多くの高齢者を救うことができる再生医療である。顎堤が頤神経孔まで下がり義歯が頤神経を圧迫し、痛くて噛めない人に骨移植とPRP・PRFを応用します。PRPやPRFは、各手術の腫脹や炎症の軽減等高齢者の救いの一手となりうる、高齢社会にとって救世主の医療である。「第8回国際血液臨床応用会議 国際特別講演会」は、東京大学鉄門講堂での開催が諸事情により2017年10月から2018年3月に変更になったが例年通り行われている。歯科医師が実際行う再生医療（PRP・PRF等）の情報源の一つである。その内容は年々細密化しているが、臨床においてすぐ活かせるものが多い。再生治療は認知性は高いが、実効性は低い。その一つの要因として、平成26年11月に施行された『再生医療等の安全性の確保等に関する法律』が挙げられると思っている。施行前はその施術に関して患者にPRP・PRF等の必要性和その安全性について説明と同意に基づいて行われていたものが、『再生医療等の安全性の確保等に関する法律』施行後はルールと規範・倫理のもと提出書類等の作成の煩雑性と共にその作成経費の発生が生じる事である。PRP・PRFと二種類を行う場合、経費は倍増する。安全性の確保において必要なことかもしれないが、血小板を凝縮し用いる場合は一種類として頂けると有り難い。また厚生労働省は、安全を確保するということで委員会を設け管理を徹底しているのは仕方がないが、施設の届を提出しルールと規範・倫理を履行しているものをより厳格に管理するよりも、施設の届も出さず、委員会も通さず、インターネットなどで再生治療を謳い行っている施設や事業所を指導することが、医療事故防止に繋がるのではないかと思う。罰則規定は何のためなのか、患者が泣いてからでは遅い。東京形成歯科研究会は、国際血液臨床応用会議を通じ参加された方々に新しい知見や様々な情報を発信すると共に、取得された情報等が臨床に応用できるようなサポートや、スポットで当研究会に参加を希望する方にも門を大きく広げています。私たち東京形成歯科研究会は法と倫理に基づいて再生治療の研究並びに臨床を患者のために行っていきます。再生治療PRP・PRF等は私たちをも助ける。これからもご参加戴けることを期待いたします。

東京大学大学院 医学系研究科外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 口腔顎顔面外科学 教授

東京大学医学部附属病院 ティッシュ・エンジニアリング部 部長

星 和人



2017 年度第 8 回 再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会開催にあたって

第 8 再生医療血液臨床応用国際特別講演会の開催、誠におめでとうございます。

今回の講演会は、研究テーマを学際的に深く掘り下げるにとどまらず、著名人の方もお呼びし、興味深いお話が拝聴できそうです。再生医療は、単なる学術研究にとどまらず、先進医療の社会実装とそれによる社会貢献をも目指す特異的な研究領域であり、研究の主体となるメンバーも、歯科医師や医師のみならず、多種多様な職種の方々によって構成されています。そのため、多角的な視点と幅広い視野を必要とします。その点で、今回の講演会は、多くのことが吸収できるものと、大変楽しみにしております。

PRP や PRF など、血液成分を用いた骨再生補助療法は、歯科治療を中心に、今後益々に普及が期待される医療分野です。学術的、医療的、社会的、倫理的、経済面などのから多角的に評価して、社会実装や政策への提言するテクノロジーアセスメントをこの講演会で、進めていただき、より優れた再生医療の発展への礎とされることを期待いたします。

公益社団法人 日本口腔インプラント学会

理事長

渡邊 文彦



「2017 年度第 8 回再生医療血液臨床応用特別講演会」開催にあたり

公益社団法人 日本口腔インプラント学会は歯科医療領域における口腔インプラント学の学術研究の推進と国民への口腔インプラント医療を通じた全身の健康維持、改善する使命を有しております。はじめに皆様からの私共の学会へのご支援、ご協力に対しまして心から感謝申し上げます。

平成 26 年 11 月に「再生医療等の安全確保等に関する法律、再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行令及び再生医療等の安全性の確保等に関する法律」が厚生労働省医政局研究開発振興課より通告され、施行されました。これは口腔インプラント治療を行う我々にも非常に関心が高いところであり、臨床応用を行っている PRP 多結晶板血漿がこの対象となります。PRP の臨床応用は組織の造成、治癒に有用であることが明らかになっております。PRP は第 3 種再生医療等に分類され、今後これを使用する場合は、計画書を提出し再生医療提供基準に合致するか認定再生医療委員会による審査を受けて、使用することになります。

この度、国内外から講師を招聘し、再生医療血液臨床応用国際特別講演会が国際血液・幹細胞臨床応用会議 (ISBB) チェアマン、一般社団法人東京形成歯科研究会理事長および施設長 奥寺 元先生を主催責任者として東京大学医学系研究教育棟 鉄門記念講堂で開催されることとなりました。本講演会を企画されました奥寺 元先生には常日頃学会活動の活性化や、若い先生方の教育等に多大なご尽力を頂いております。この場をお借りしてお礼申し上げます。本講演会が盛況に開催されますこと、および先生方がこの講演を糧に確実でより信頼される医療を目指されることを祈念して開催のお祝いとさせていただきます。

講演会名称	2017 年度第 8 回 再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会
テ ー マ	歯科領域における再生医療の基礎・臨床と長寿社会に向けてのプロローグ
主 催	一般社団法人 東京形成歯科研究会（TPDS）／国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB）
後 援	一般社団法人 日本再生医療学会／東北口腔インプラント研究会
開 催 日 程	2018 年 3 月 25 日（日曜日） 10:00～17:00 ※時間帯は変更となる場合がございます。
開 催 場 所	東京大学 医学部研究科教育研究棟 14F 鉄門記念講堂 〒113-8654 東京都文京区本郷 7-3-1 TEL.03-3812-2111(代表)
参加登録費	一般 25,000 円 ／ 一般社団法人 東京形成歯科研究会 無料
主催責任者	一般社団法人 東京形成歯科研究会 施設長・理事長 国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB） チェアマン 医学博士 奥寺 元

本講演会の目的と開催意義

再生医療新法施行により PRP・PRF（CGF）・PRGF 血液製剤臨床応用等が再生治療として導入されましたが、未だにその明確なエビデンスがない状況であり、研究研鑽が必要とされます。まして、安全・安心の手技についても情報不足であるため、より安全・安心そして臨床効果のある、このような講演会を今後も継続して提供してまいります。

本講演会 過去の開催

開催年	開催地	テーマ／学会名称
2003	東京	PRP 至適条件の臨床的意義 他
}		
2013	ソウル	The 1st Congress of Asia Anti-Aging&Regenerative Medicine
2014	パリ	SYFAC 第 7 回国際 Growth Factors
2014	東京	血液再生材料臨床応用・PRF・PRP 製作、PRF・PRP・トロンビン応用について他
2014	仙台	アジア・パシフィックアカデミーインプラント口腔医学会他
2015	東京	血液生体材料臨床応用における PRP 及び PRF 各種 Growth Factor の基礎と臨床、再生新法の解釈と実地について他
2015	東京	再生医療新法施行 自己血由来の成長因子を用いた再生療法 ～その理論と実際～
2016	東京	歯根膜細胞シートを用いた歯周組織再生治療と歯根膜付インプラントの可能性について
}		
2016	東京	骨補填材の臨床応用／PRP・PRF
2017	東京	待時埋入と抜歯即時埋入の術式の違い
}		
2017	東京	上顎前歯部欠損症例に対するインプラント埋入術

実行委員会メンバー：

- 実行委員長（事務局長兼務）：奥寺 元（一般社団法人 東京形成歯科研究会 施設長・理事長／国際血液・幹細胞臨床応用会議 ISBB チェアマン／公益社団法人日本口腔インプラント学会元理事 代議員／ICOI 元会長）
- 実行副委員長：古谷田 泰夫（一般社団法人 東京形成歯科研究会 会長）
- 実行副委員長：柳 時悦（一般社団法人 東京形成歯科研究会 監事）
- 運営担当：押田 浩文（一般社団法人 東京形成歯科研究会 事務局）

東京大学 本郷キャンパス 医学部研究科教育研究棟 鉄門記念講堂

〒113-8654 東京都文京区本郷 7-3-1 東京大学医学部教育研究棟 14 階

TEL.03-3812-2111(代表)

■最寄り駅

都営地下鉄『大江戸線・本郷三丁目駅』4 番出口より『懷徳門』経由徒歩 2 分

東京メトロ地下鉄『丸ノ内線・本郷三丁目駅』2 番出口より『懷徳門』経由徒歩 5 分

■最寄り門

『龍岡門』より徒歩 1 分

『赤 門』より徒歩 1 分

『懷徳門』より徒歩 1 分

『春日門』より徒歩 1 分

■タクシー利用目安

「東京駅」にて乗車： 1200・1500 円（約 20 分）

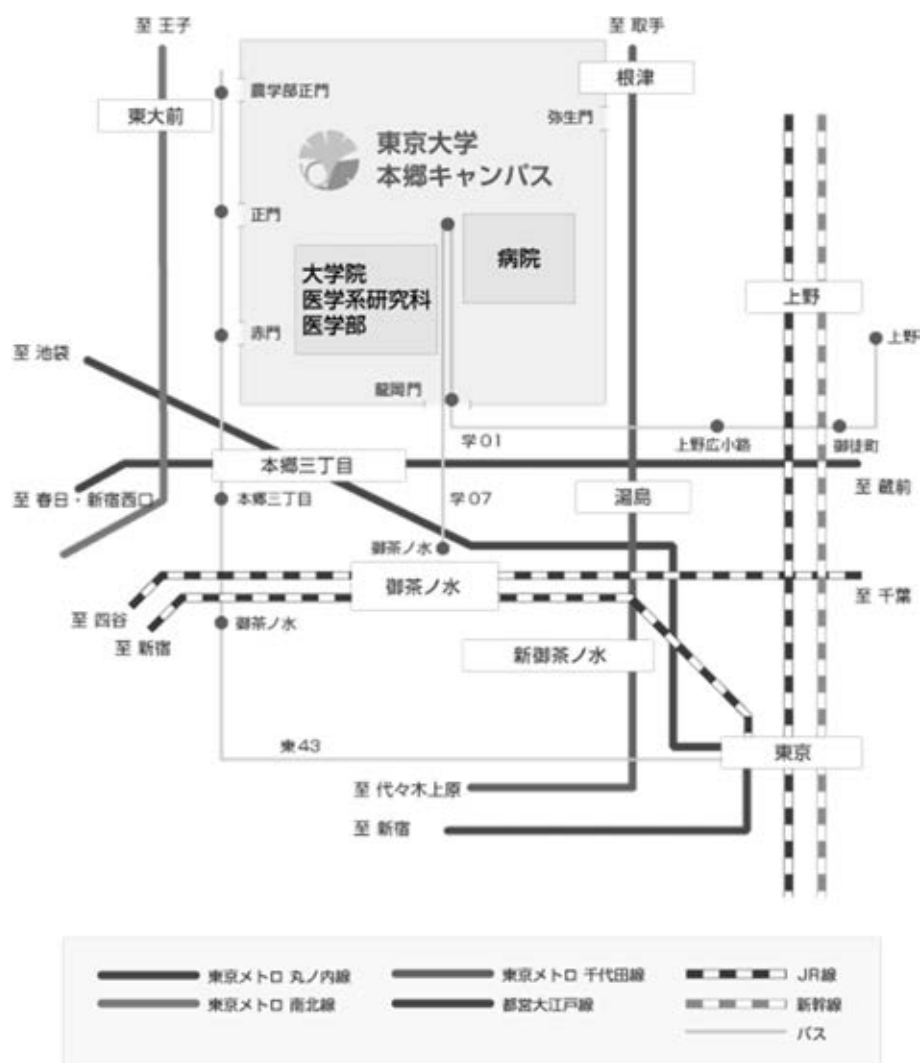
「浜松町駅」にて乗車： 2200・2600 円（約 30 分）

「新宿駅」にて乗車： 2300・2700 円（約 30 分）

「品川駅」にて乗車： 3200・3800 円（約 40 分）

※タクシーをご利用の際は、「龍岡門」より入構してすぐ左手の「本郷キャンパス本部棟前」までお越し頂くと便利です。

○東京大学 本郷キャンパスまでのアクセス



○東京大学 本郷キャンパス内 案内図

講演会会場 “鉄門記念講堂”……………「医学部教育研究棟」14 階



●3月25日（日曜日）

9:30～10:00「受付」

10:00～10:05「開会式」 “開会の挨拶” 一般社団法人 東京形成歯科研究会 会長 古谷田 泰夫

10:05～10:55「基調講演」

講演時間	演 題				
	講演者	国籍	所属	座長 ①	座長 ②
10:05 ～ 10:55	川瀬 知之	日本	新潟大学大学院医歯学総合研究科歯科薬理学分野 准教授／日本歯科大学新潟生命歯学部客員教授	大島 勇人（新潟大学大学院医歯学総合研究科歯科薬理学分野 顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野 教授／一般社団法人日本再生医療学会 理事）	渡辺 泰典（一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事／あけぼの歯科）

11:00～11:55「口頭発表 ～口腔組織の再生の臨床と実際～」※各発表時間：15分（質疑・応答5分含む）

講演時間	演 題				
	講演者	国籍	所属	座長 ①	座長 ②
11:00 ～ 11:15	豊田 寿久	日本	一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事／報徳歯科	渡辺 孝夫（一般社団法人 東京形成歯科研究会／厚生歯科）	川端 秀男（一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事／早稲田駅前デンタルクリニック）
11:20 ～ 11:35	月岡 庸之	日本	一般社団法人 東京形成歯科研究会 副会長／つきおか歯科医院	鈴木 富士雄（一般社団法人 東京形成歯科研究会 参与／二の宮歯科医院）	秋知 明（一般社団法人 東京形成歯科研究会／アキチ歯科医院）
11:40 ～ 11:55	鈴木 正史	日本	一般社団法人 東京形成歯科研究会 副会長／銀座柳通り歯科クリニック	磯邊 和重（一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事／いそべ歯科医院）	鳥村 敏明（一般社団法人 東京形成歯科研究会 相談役／テルミナ歯科クリニック）

11:55～13:00「昼食／休憩」

13:00～14:00「基調講演」

講演時間	演 題				
	講演者	国籍	所属	座長 ①	座長 ②
13:00 ～ 14:00	歯科における再生医療はどこまで進んだか？				
	細川 隆司	日本	九州歯科大学附属病院副 病院長／口腔再建リハビ リテーション学分野教授 ／附属病院口腔インプラ ント科科长	古澤 利武（東北口腔イ ンプラント研究会 施設 長／古澤歯科医院）	木下 三博（一般社団法 人 東京形成歯科研究 会 副会長）

14:05～15:00「口頭発表 ～口腔ケアから生まれるアンチエイジング～」※各発表時間：15分（質疑・応答5分含む）

講演時間	演 題				
	講演者	国籍	所属	座長 ①	座長 ②
14:05 ～ 14:20	アンチエイジング・オーラルフレイル予防 vs 「よい噛み合わせ」				
	西山 和彦	日本	一般社団法人 東京形成歯 科研究会 理事／あい歯科 クリニック	樋口 真弘（一般社団法 人 東京形成歯科研究会 ／ヒグチ歯科医院／桂 林医科大学口腔科 客員 教授）	田中 強（一般社団法人 東京形成歯科研究会／ 田中歯科／桂林医科大 学口腔科 客員教授）
14:25 ～ 14:40	若さを保つ秘訣は自分の歯で咬めること～Cure から Care の予防の時代へ				
	江崎 友大	日本	一般社団法人 東京形成歯 科研究会／江崎デンタル クリニック	菊池 龍介（一般社団法 人 東京形成歯科研究会 理事／K.i 歯科）	牧 浩壽（一般社団法人 東京形成歯科研究会／ 牧歯科医院）
14:45 ～ 15:00	自然界より受け止めるアンチエイジング～家畜化した日本人への提言 Buck to the nature! ～				
	北村 豊	日本	一般社団法人 東京形成歯 科研究会 相談役／信州口 腔外科インプラントセン ター／フィリピン ナショ ナルユニバーシティ（マニ ラ） 客員教授	相澤 八大（一般社団法 人 東京形成歯科研究会 理事／あいざわ歯科ク リニック）	出澤 政隆（一般社団法 人 東京形成歯科研究 会／佐倉歯科医院）

15：00～15：20「休憩」

「調印式」 3D グローバルバイオテック（台湾）×オクデラメディカル（日本）

「授与式」 3D グローバルバイオテック研究所（台湾） 客員研究教授就任

15：20～16：20「基調講演」“市民公開講座”

講演時間	演 題				
	講演者	国籍	所属	座長 ①	座長 ②
15:20 ～ 16:20	三浦 雄一郎	日本	㈱ミウラ・ドルフィンズ 代表取締役／クラーク記念国際高等学校校長／(社)全国森林レクリエーション協会会長／NPO 法人グロートハル・スポーツアライアンス理事長／厚生労働省いきいき健康大使／国連WFP 協会親善大使 他	梅原 正年（青森インプラント研究会／梅原歯科医院）	増木 英郎（一般社団法人東京形成研究会 理事／エルム駅前歯科医院クリスタル）

16：25～16：55「パネルディスカッション」

時 間	テーマ			
	パネリスト		座長 ①	座長 ②
16:25 ～ 16:55	三浦 雄一郎×細川 隆司×星 和人（東京大学大学院医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学講座 口腔顎顔面外科学 教授） ×川瀬 知之×石川 烈（東京医科歯科大学 名誉教授／東京女子医科大学先端生命医科学研究所 特任顧問）		奥寺 元（一般社団法人東京形成歯科研究会 理事長・施設長／ISBB チェアマン／王子歯科美容外科クリニック）	調整中

16：55～17：00「閉会式」 “閉会の挨拶” 一般社団法人東京形成歯科研究会 監事 柳 時悦

「東京形成歯科研究会創立 35 周年記念パーティー（祝賀会）」

日時：2018 年 3 月 25 日（日）17:15～

会場：「Capo PELLICANO 本郷店」 東京大学医学部研究科教育研究棟 13F 住所 東京都文京区本郷 7-3-1

プログラム： ※敬称略

開会挨拶 一般社団法人東京形成歯科研究会 施設長・理事長 奥寺 元

来賓 挨拶 川添 堯彬 三浦 雄一郎 Keng-Liang Ou

来賓紹介

感謝状贈呈・挨拶 宝田 明

感謝状贈呈 創立貢献者代表 黒山 巖

感謝状贈呈 永年会員・貢献者代表 一般社団法人東京形成歯科研究会 理事 鈴木 富士雄

乾杯 発声 一般社団法人東京形成歯科研究会 名誉顧問 小嶋 榮一

歓談

JSOI 認定講習会修了者への励ましの言葉 一般社団法人東京形成歯科研究会 副会長 鈴木 正史

JSOI 認定講習会 終了式 終了証授与&撮影

歓談

中締め 挨拶 一般社団法人東京形成歯科研究会 会長 古谷田 泰夫



「基調講演」

3月25日(日) 10:05～10:55

演題: 歯科における再生医療 PRP はどこまで研究(解明)がすすんだか?

講演者: 川瀬 知之

抄録:

最近、僭越ながら、PRP に関する総説やコメントリーを書く機会が増え、最新の知見だけでなく、PRP 研究の歴史的背景にもこれまで以上に注意を払うようにしている。ガラパゴス化したわが国では、PRP の学問的価値は概して低く見られているが、アメリカでは、歯科が撒いた PRP の種が、いままさにスポーツ医学や整形外科の分野で目的にも医療的にも花を咲かせようとしている。

PRP 研究の歴史は大きく 4 期に分けられる。第一期は、血小板と増殖因子の濃縮の検証、第二期は抗凝固剤を使用しない調製法の開発、第三期は増殖因子の徐放性の比較検討、そして第四期は白血球混入の是非の検討である。並行して、血管新生や抗菌活性と疼痛緩和に関する研究、フィブリンによる相乗効果などの興味的な研究も散見されるが、PRP 研究の主流(流行)にはなりえなかった。

然るに PRP の有効性に対する疑念は依然として根強い。演者は、その原因の一端を徹底した性状分析の欠如と薬物治療の基本的考え方からの逸脱にあるとみている。たとえば、われわれは *in vitro* で濃縮された血小板が取る挙動についてどれくらいのことを理解しているだろうか。あるいは、増殖因子以外にもエキソソームや転写因子の関与はないのだろうか。一方、薬物治療には第一選択や適応症という考え方があるが、これまで PRP が有効(無効)な症例の見極め方というものが提唱されてきただろうか。「万人が持っている創傷治癒力を応用する」とはいうが、PRP は決して万能の再生薬ではない。

PRP 研究のトレンドという大局とともに、地味ではあるが、「徹底した性状分析」を旗頭に取り組んできたわれわれの共同研究成果をあわせて紹介し、今後の研究の目指すべき方向性について考察したい。

プロフィール:

略歴	2013 年 九州大学大学院歯学研究院非常勤講師 (～2014 年)
1985 年 新潟大学歯学部卒業	現在に至る
1985 年 新潟大学大学院歯学研究科入学	
1986 年 同 中退	所属
1986 年 新潟大学歯学部助手	新潟大学大学院医歯学総合研究科
1990 年 博士(歯学)学位の取得	顎顔面再建学講座 歯科薬理学分野 准教授
1991 年 マイアミ大学医学部長期留学 (～1993 年)	日本歯科大学新潟生命歯学部 客員教授
1992 年 新潟大学歯学部講師	
1993 年 新潟大学歯学部助教授	
1997 年 カンザス大学医学部短期留学 (～1998 年)	
2002 年 新潟大学大学院医歯学総合研究科准教授に配置転換	
2012 年 日本歯科大学新潟生命歯学部客員教授	



「口頭発表」

3月25日(日) 11:00～11:15

演題:血液生体材料 PRP 式を用いた長期症例 組織像他

講演者:豊田 寿久

抄録:

東京形成歯科研究会では PRP の有用性に着目し Dr MARX を招請し Live Ope を行っていましたが、私が Dr MARX の講演を聞いたのは横浜が初めてでした。その内容に感激して以来、PRP を臨床に応用して 15 年が過ぎました。いまは補填材としては Xenograft を用い PRP と併用しています。臨床家として一番大切なことは新しい材料や機材が出てきたときに、それを臨床に用いた直後の実感、真に素晴らしいものであれば“これは良いな”と直感できるはずです。そのような感性が開業医には必要なのだと思います。PRP を用いた時も“これは良いな”という直感がはたらきました。今回は PRP を Sinus Graft に用いて 10 年以上経過した症例を供覧し、同部が X 線的、組織的にどの様に変化したのかを見てみたいと思います。Xenograft を用いた症例の造成部はほとんど吸収を示さず安定しています。組織的には層板構造を示し成熟した骨がインプラント周囲を取り巻いています。これに反して Allograft を用いた症例ではかなり吸収を示し、このあとどうなるのかと不安に思うことも経験しています。臨床家として GBR を行うに際し大切にしていることをお話したいと思います。

プロフィール:

略歴

昭和 60 年 九州大学歯学部卒業

埼玉医科大学口腔外科入局

昭和 62 年 同大学口腔外科助手

平成 4 年 医学博士

埼玉医科大学口腔外科非常勤講師

現在 報徳歯科院長

所属

日本口腔インプラント学会専門医

韓国国際口腔インプラント学会特別会員



「口頭発表」

3月25日(日) 11:20～11:35

演題: 歯周軟組織再生を試みて

講演者: 月岡 庸之

抄録:

インプラント治療を成功に導くためには、硬組織のみならず軟組織の質と量が必要不可欠な条件となる。

特別な症例を除き、通常インプラント埋入は抜歯窩に施行される事が一般的であり、その際には抜歯時期により軟組織および硬組織の欠損または不足に対する増生または温存などを常に考慮しなければならない。

特に軟組織においては上部構造の装着後も常に影響を受ける部分であり慎重に対応して行く必要がある。現在その方法については様々なものがあり、遊離歯肉移植、有形弁歯肉移植など既存歯肉組織の使用またコラーゲン由来の吸収性材料の使用などが多く使用されている。

しかしながらいずれの方法も侵襲の大きさや効果の限界などの問題があり症例ごとに手技を選択しなければならない。

その中でも近年細胞増殖因子を利用した治療が注目されており、海外では遺伝子組み替え型血小板由来増殖因子(GEM21S®)や遺伝子組み替え型骨誘導因子(INFUSE Bone Graft®)エナメルマトリックス(EMDOGEN®)、国内では組換え型ヒトbFGF(リグロス)などを用いた方法がすでに使用されている。さらに本邦は再生医療法の整備に伴い自家血由来の濃縮血小板血漿の使用が許され、いわゆる PRP(Platelet-rich plasma)派生物質の使用が可能である。これは、血小板由来の増殖因子とフィブリンなどの細胞接着分子を含んだ両方のタンパク質を応用する方法であり、インプラント治療に応用する事で周囲組織治癒や GBR の形態コントロールの簡易化などを促進する可能性がある。今発表では臨床例を交えながら使用法及び応用方法について提示し本法について理解を深める。

プロフィール:

略歴

1988 年日本大学松戸歯学部卒業

1988 年日本大学医学部 歯科口腔外科教室入局

1997 年つきおか歯科医院開設

1999 年医療法人庸明会つきおか歯科医院 理事長

2013 年日本大学松戸歯学部 放射線学講座 兼任講師

2014 年日本大学松戸歯学部 臨床教授

所属 資格

東京形成歯科研究会 副会長

日本口腔インプラント学会 専門医

日本歯科放射線学会 認定医

日本顎顔面インプラント学会会員

日本口腔外科学会会員

ITI Fellow

ITI Study Club, Packs Tokyo Director

連絡先

〒179-0076 東京都練馬区土支田2-29-16

医療法人社団 庸明会 つきおか歯科医院



「口頭発表」

3月25日(日) 11:40～11:55

演題: Facial Control～PRFを用いたインプラントの臨床～

発表者: 鈴木 正史

抄録:

Prof. 奥寺 元 先生が歴史的に先駆けて提唱しているのは、「顎顔面美容口腔外科治療」と「血液成長因子・再生治療臨床応用」です。その中で、PRFを用いたインプラント臨床の症例報告を供覧させていただきます。「顎骨の保全と再生」とともに、咬合のフルリコンストラクションは極めて重要なリハビリテーションとされ重要視されています。

さらに審美ゾーンにおける整然と並んだ歯列の連続性による「美しい口元」と「顔貌回復」の必要性がクローズアップされてきています。

顎顔面美容口腔外科治療において、口元を含む歯科美容において、下顔面 3 分の1の再構成が対象とされ歯科美容的回復と審美的改善が可能とされています。

現在、前歯を含むインプラントを用いた咬合再構成による欠損補綴にて、フルマウスリコンストラクションを行うにあたって、「顎顔面の美容」に良好な審美的改善と変貌と改善を得ることを目標としています。

治療を受けた患者さんが、口唇との調和・審美的な歯列と咬合機能回復のみならず、日常の食生活、社会生活において、精神的満足を伴う「顔貌回復と美容」の結果につながる。それは、標準的な美容外科治療として提唱され確立されてきている。

今回、私どもの臨床治験により、インプラントおよびアンカーインプラント矯正なども含めた

数例の症例提示と経過を通じて、検討を加え報告させていただきます。

今後、更なる検討を加え、エビデンスデータの集積とともに、より良い医療提供の方向性への改善が必要であると考えられます。口元の歯科美容と顎顔面のアンチエイジング、ウェルエイジングの発展に寄与するべく、今後も日々、目前の臨床に向き合っていく所存です。

今回の報告が、美容医療の発展、患者様の笑顔と幸福医療へ、先生方の日常診療の一助となれば幸いです。

(今回の症例報告は、第101回、103回、105回日本美容外科学会、国際アジア美容外科学会発表を終えた同内容を含むものです。)



プロフィール:

略歴 所属

歯学博士: 東京歯科大学 解剖学

日本口腔インプラント学会認定 専修医・専門医

日本口腔インプラント学会認定臨床研修施設・(一般社団法人)東京形成歯科研究会副会長

ISBB 認定医・顎顔面美容外科認定医

医療法人社団 GY 会理事長・銀座柳通り歯科クリニック/GY 歯科美容外科総合インプラントセンター

東京都中央区京橋歯科医師会/中央区京橋歯科警察医会 会員

東京歯科大学東京中央区京橋支部学術担当幹事

日本歯科用レーザー・ライト学会理事

その他 学会、研修、社会活動など多数



「基調講演」

3月25日(日) 13:00~14:00

演題: 歯科における再生医療はどこまで進んだか?

発表者: 細川 隆司

抄録:

歯科の歴史は、失われた口腔組織を取り戻すチャレンジの歴史であったと言っても過言ではない。その歴史の中で、究極の組織再生の切り札として、今、再生医療に大きな期待が寄せられている。医科においては、1950年代後半からミリポア®フィルターを用いた周囲組織排除による神経組織の再生療法が試みられ(図1)、歯科は25年ほど遅れて1982年にNymanらからミリポア®フィルターを用いた、いわゆるGTR(Guided Tissue Regeneration)法による歯周組織の再生療法が示された。その後、再生の場を提供することによって組織再構築を行う様々な術式は、この40年で格段に進歩してきた。しかし、この物理的方法での組織再生誘導法は、限界もあり、新たなブレイクスルーが求められた。それが今、多くの基礎的研究を経て、このブレイクスルーが成し遂げられ、ようやく医療現場に持ち込まれつつある。その一つが、各種成長因子の応用(血液由来成分の応用も含む)であり、もう一つが幹細胞やiPS細胞などを用いた細胞工学の応用である。本講演では、医学・歯学領域の再生医療のこれまでの歩みを俯瞰しつつ、現在の歯科における再生医療の現状と到達点(図2)を示したい。同時に、再生された組織は恒常性を保てるのか、あるいは、失った原因を明らかにしないままに組織を再生させても、再び同じ原因で再生組織が失われる危険性はないか、高額な医療費負担をどうするかなど、再生医療に関する様々な問題点についても議論を深めたい。

図1 ミリポア®フィルターを用いた神経組織再生実験

(Bassett et al., Exp. Neurol. 1:388, 1957)

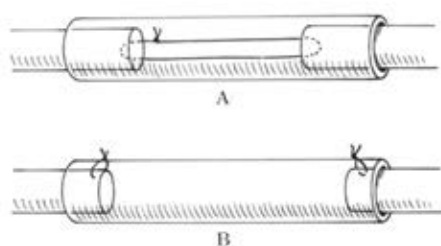
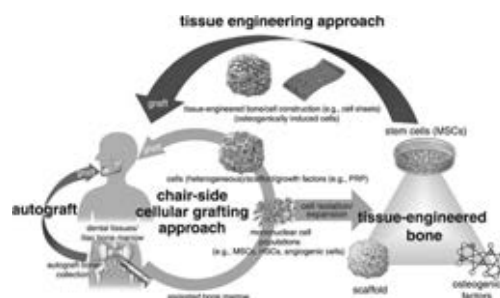


図2 歯科領域における再生医療

(Egusa et al., J Prosthodont Res. 56:235, 2012)



プロフィール:

講演者肩書き

九州歯科大学附属病院副院長／口腔再建リハビリテーション学分野教授／附属病院口腔インプラント科科长

略歴 所属

昭和61年3月	九州歯科大学歯学部卒業	平成11年12月	広島大学歯学部講師
昭和61年4月	九州歯科大学大学院歯学研究科入学	平成15年5月	九州歯科大学教授(歯科補綴学第二講座)
平成1年4月	日本学術振興会特別研究員DC採用	平成16年10月	九州歯科大学教授(口腔再建リハビリテーション学分野)
平成2年3月	九州歯科大学大学院歯学研究科修了 歯学博士授与		九州歯科大学附属病院口腔インプラント センター長
平成2年4月	ハーバード大学歯学部博士研究員	平成24年4月	九州歯科大学歯学部長
平成3年4月	九州歯科大学歯学部助手(歯科補綴学第二講座)	平成28年4月	九州歯科大学附属病院副院長
平成7年4月	広島大学歯学部助手(歯科補綴学第一講座)		現在に至る

「口頭発表」

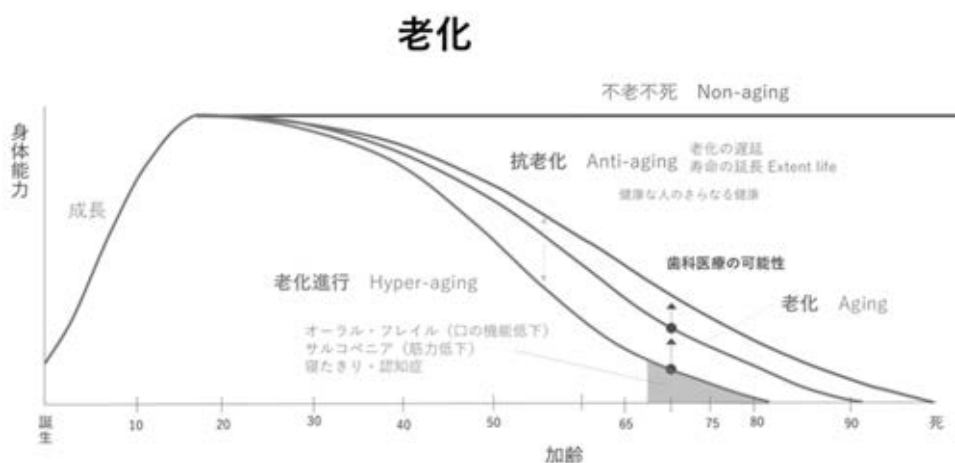
3月25日(日) 14:05～14:20

演題:アンチエイジング・オーラルフレイル予防 vs 「よい噛み合わせ」

発表者:西山 和彦

抄録:

アンチエイジングには「寿命を延ばす」という意味と「老化を遅らす」という意味がある。前者については、今や80歳を超えた。しかし、高齢化が進むことで、認知症や寝たきりが社会問題となってきて、対処が求められている。健康寿命を延ばし、一億総活躍社会を目指すのが政府のプランのようである。オーラルフレイル(口の機能の衰え)が進行すると、サルコペニア(筋肉量減少・筋力低下)により寝たきりになるということから、口の機能を衰えさせないようにすることが提唱されている。口の機能に多くの歯の存在は欠かせないが、8020運動が提唱するような、ただ多くの歯が残っていることだけでいいのだろうか？ 否、上下の歯が「よい噛み合わせ」であって初めて口の機能を発揮できる。歯がなくなったときの入れ歯も同様である。まして、インプラントはそれ以上の効果を発揮する。よい噛み合わせの条件を説明する。このような状態では姿勢バランスが整い、立つ動くことが可能となる。よく咀嚼することにより、噛む筋肉が働き、脳への血流量が増加し、記憶を司る海馬を賦活する。さらに、よく唾液が出て、新陳代謝を盛んにすると同時に、「嚥下」(飲み込む運動)しやすいようにして、複雑な脳神経支配により行われる嚥下が行われる。また、栄養摂取以外に味覚・視覚・臭覚が総動員させて食事を楽しみ、脳が喜ぶ。このような噛んで、飲み込む「身体の働き」はすなわち、「生きる力」である。



プロフィール:

略歴

東北歯科大学卒業・口腔外科学第一講座 入局(1979年)

ハンブルグ大学 顎・顔面・口腔外科 留学(1982～1983年)

退局、現在地にて開業(1987年)

所属

日本口腔インプラント学会 専門医

日本顎咬合学会 指導医

日本構造医学会 認定医

ISBB(The International Society of Blood Biomaterials)認定医

International College of Dentistry(国際歯科学士会)日本部会 理事(F.I.C.D.)

日本医用歯科機器学会 評議員

東京形成歯科研究会 理事



「口頭発表」

3月25日(日) 14:25～14:40

演題:若さを保つ秘訣は自分の歯で咬めること ～Cure から Care の予防の時代へ～

発表者:江崎 友大

抄録:

当医療機関では、虫歯、歯周病、義歯、インプラント治療希望患者を含む全ての患者に対し初期治療に重点を置き、一連の流れ(メディカルトリートメントモデル:MTM)に沿った診療を行っている。虫歯や歯周病他あらゆる治療に入る前に、「なぜ自分は今の状態になったのか、原因は何なのか」「今後虫歯、歯周病になるリスクはどのくらいあるのか」「口腔内に虫歯菌がどれほどいるのか」等、現在の口腔内現状や将来のリスクを患者に把握し理解してもらう。このような初期治療時の十分な動機付けや患者のデンタルIQを高めることにより、口腔内への関心が高まり、患者自身が治療後の口腔内をより一層守ろうとする意識が高まる。そして自然と長期定期メンテナンスへと繋がっていく。イコール自分の多くの天然歯を保存することができる。現在治療の必要がなく、しかし定期検査や歯のクリーニングにも定期的に歯科医院に行かれない患者さんの知人や家族の方にも予防の大切さを説明していただき、歯を削る治療などなるだけ歯に侵襲を加えないようにする予防の大切さも説明していただくようにしている。自分の歯で咬めることはいろいろな食べ物を咀嚼でき、美味しい味を感じ、身体的および精神的両方において健康と幸せを感じることができる。講演では初診からメンテナンスまでの一連の流れと当医療機関での取り組み方などをスライドと共に説明させていただく。

プロフィール:

東京都世田谷区開業

医療法人社団 友優会 江崎デンタルクリニック 理事長

略歴

1982年 福岡歯科大学卒業

1992年 米国ボストン大学歯学部大学院卒業

1989年 歯科補綴専門医取得、

1991年 マスターオヴサイエンス取得

1992年～1997年:国際デンタルアカデミー 勤務

全日制研修部長

1997年 医療法人社団 友優会 江崎デンタルクリニック開設

以上

2008年 オーラルフィジシャン認定

2009年 国際口腔インプラント学会 指導医

ドイツ口腔インプラント学会(DGZI)スペシャリスト取得



「口頭発表」

3月25日(日) 14:45～15:00

演題：自然界より受け止めるアンチエイジング～家畜化した日本人への提言 Buck to the nature！～

発表者：北村 豊

抄録：

医学的には、アンチエイジングを抗加齢と理解する日本抗加齢医学(アンチエイジング医学)会があり、加齢という自然な生物学的プロセスへの介入により加齢関連疾患の発症確率を下げ、単なる寿命ではなく、「健康長寿」をめざす医学であります。医師の間でも、功罪は別にしてこの定義から大きく逸脱した用い方をしている人達も多いことは事実であります。

私に与えられた“自然に対する…”というタイトルの今回の講演では、あまりにも漠然と大きすぎますが、私自身が若い時に青年海外協力隊員として活動した、わずか3年間のマレーシアの世界最古の熱帯降雨林、すなわちジャングルでの経験をもとに、人類学的に言われている“自己家畜化”して、“不自然”な“コンクリートジャングル”の中で生活や労働をされている多数の参加者の皆様に、医学的根拠に基づく方向に話が進むよう努力して、講演をする予定であります。

山梨大学の川平の研究フィールドは、アフリカのジャングルではありませんが、ここに住む狩猟採集民は、先進国の人に比べて加齢に伴う血圧上昇の傾向が見られないことも報告されています。

また日本での森林浴の研究でも、ストレスホルモンの減少、副交感神経活動の高まりとそれとともなって交感神経活動の抑制が見られます。またNK活性の上昇が認められ、抗がんタンパク質の増加、「ストレスホルモン」ともいわれる唾液中のコルチゾール濃度が都市部に比し低下することなどが判ってきています。

上記のような科学的に実証されていることに加え、日本ですすめられているバリアフリーとは真逆の環境の「バリアだらけ」の世界最古の森で生活するマレーシア先住民の生活についても紹介できればと考えており、そこには私達の生活を見直す重要なヒントがあると信じています。

プロフィール：

略歴

昭和50年3月 神奈川歯科大学歯学部歯学科卒業

昭和61年12月 歯学博士号取得(神奈川歯科大学)

平成4年4月 近畿大学医学部形成外科教室へ短期留学

昭和50年4月 松本歯科大学助手(口腔外科学第1講座)

元松本歯科大学助教授(口腔外科学第1講座)

元医療法人新生病院口腔外科医長(長野県上高井郡小布施町)

昭和61年12月 歯学博士 学位受領

現在 信州口腔外科インプラントセンター所長

松本歯科大学客員教授(海外交流部門)

神奈川歯科大学人体構造応用研究所特任講師

フィリピン ナショナルユニバーシティ(マニラ) 客員教授

松本歯科大学臨床教授(口腔顎顔面外科学講座)

所属

免許

日本口腔外科学会認定専門医

日本口腔外科学会認定指導医

日本口腔インプラント学会専門医

日本顎顔面インプラント学会指導医



「基調講演」

3月25日(日) 15:20～16:20

演題:健康寿命への飽くなき探求!

発表者:三浦 雄一郎

抄録:

プロフィール:

肩書き プロスキーヤー・冒険家、クラーク記念国際高等学校校長

略歴

生年月日 1932年10月12日

1932年青森市に生まれる。1964年イタリア・キロメーターランセに日本人として初めて参加、時速172.084キロの当時の世界新記録樹立。1966年富士山直滑降。1970年エベレスト・サウスコル8,000m世界最高地点スキー滑降(ギネス認定)を成し遂げ、その記録映画[THE MAN WHO SKIED DOWN EVEREST]はアカデミー賞を受賞。1985年世界七大陸最高峰のスキー滑降を完全達成。2003年次男(豪太)とともにエベレスト登頂、当時の世界最高年齢登頂記録(70歳7ヶ月)樹立。2008年、75歳2度目、2013年80歳にて3度目のエベレスト登頂(世界最高年齢登頂記録更新)を果たす。アドベンチャー・スキーヤーとしてだけでなく、全国に1万人以上生徒がいる広域通信制高校、クラーク記念国際高等学校の校長も務める。記録映画、写真集、著書多数。

賞 プロスポーツ大賞殊勲賞、スペイン山岳会名誉会員、アカデミー賞長編記録映画部門、世界山岳探検会議特別会員、ワシントン州名誉市民、ニューヨーク映画祭ゴールデンイーグル大賞(南極)、国際探検映画祭・冒険探検特別賞、内閣総理大臣表彰、フランス政府スポーツ青少年功労賞金賞、スーパババ・ゴルカ・ダクシナ・バフ勲章(ネパール政府)、青森名誉市民、弘前市民栄誉賞、青森名誉市民特別功労賞、青森県民栄誉大賞、深川市民栄誉賞、日本スポーツグランプリ賞、北海道民栄誉賞、東京都名誉都民 他

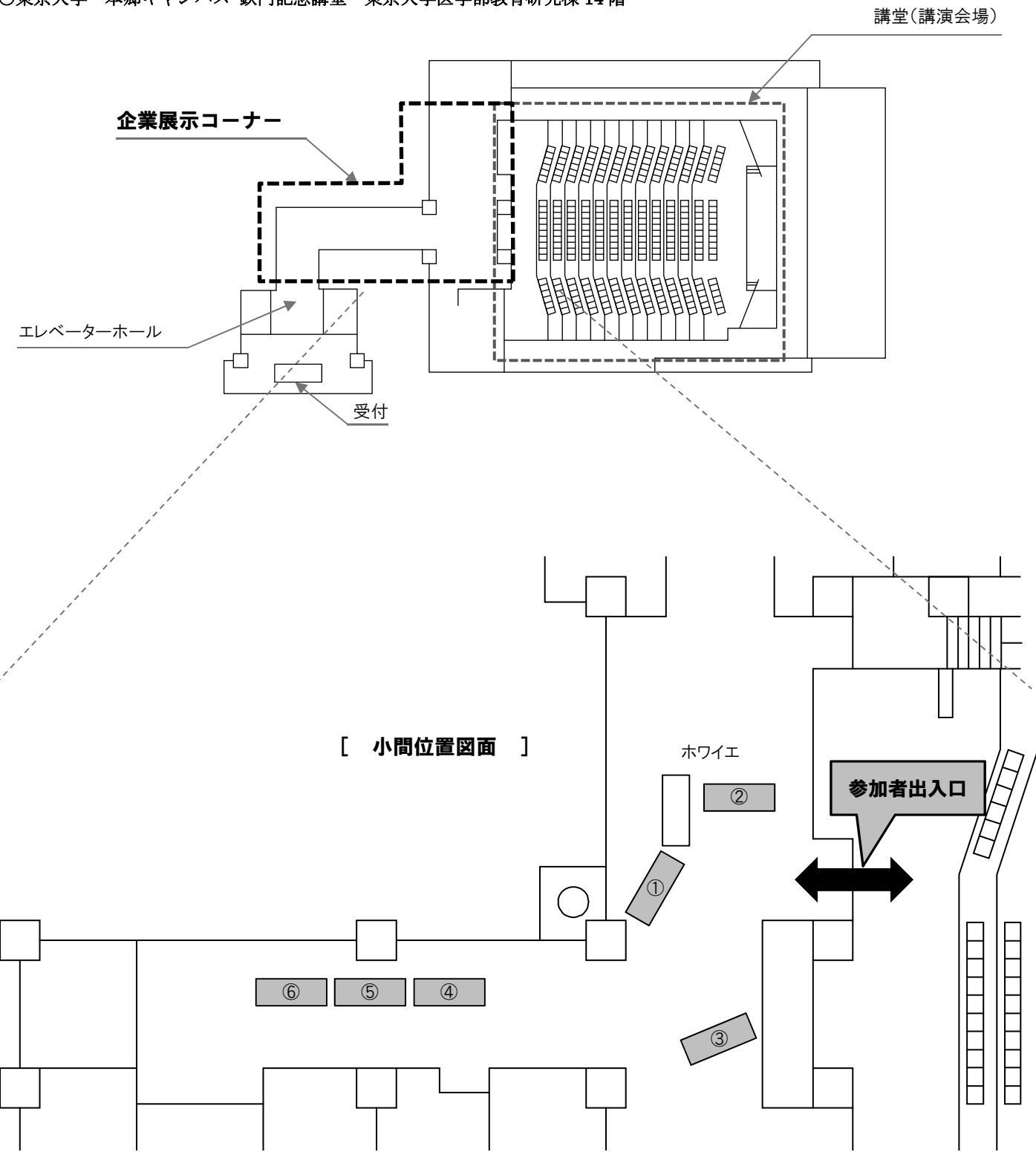
所属

(株)ミウラ・ドルフィンズ 代表取締役／クラーク記念国際高等学校校長／(社)全国森林レクリエーション協会会長／NPO法人グローバル・スポーツ・アライアンス理事長／厚生労働省いきいき健康大使／国連WFP協会親善大使 他



企業展示コーナーへお立ち寄りください。

○東京大学 本郷キャンパス 鉄門記念講堂 東京大学医学部教育研究棟 14 階



①株式会社ジオメディ	③株式会社ブレンベース	⑤オクデラメディカル
②有限会社オーラス	④株式会社 OSSTEM JAPAN	⑥王子デンタルラボラトリー（奥寺医療ビル有限会社）

企業名 company name 株式会社ジオメディ www.geomedi.co.jp
 担当者 the person in charge 取締役／部長 盧 永剛（ロ エイゴウ）
 住所 address 〒812-0016 福岡県福岡市博多区博多駅南一丁目7番22号 ブックローンビル 6F・7F
 TEL 092-409-4050 / FAX 092-409-4051 / E-mail info@geomedi.co.jp
 取扱い製品（サービス） handling product（service） インプラントソリューション、CAD／CAM ソリューション

企業名 company name 株式会社ブレンベース www.brain-base.com
 担当者 the person in charge 営業部 細川 晶子（ホソカワ アキコ）
 住所 address 〒140-0014 東京都品川区大井 1-49-15 アクセス大井町ビル 6F
 TEL 03-3778-0745 / FAX 03-3778-4910 / E-mail hosokawa@brain-base.com
 取扱い製品（サービス） handling product（service） Arrow Bone-β-Dental. β パウダー

企業名 company name 有限会社オーラス www.olas.co.jp
 担当者 the person in charge 三浦 孝之
 住所 address 〒349-0217 埼玉県白岡市小久喜 874-1 新和ビル 201
 TEL 0480-93-1218 / FAX 0480-44-8866 / E-mail olas@olas.co.jp
 取扱い製品（サービス） handling product（service） 歯科外科器械・インプラント用ドレープ

企業名 company name 株式会社 OSSTEM JAPAN jp.osstem.com
 担当者 the person in charge 李 今朱（イ クンジュ）
 住所 address 〒144-0051 東京都大田区西蒲田 5-27-14 日研アラインビル 4F
 TEL 03-5714-5955 / FAX 03-5714-5956 / E-mail kj.lee@osstem.com
 取扱い製品（サービス） handling product（service） SS／VS／TS Fixture・Abutment、Cas. Las. Taper. 123、Esset KIT

企業名 company name オクデラメディカル okuderamedical.main.jp
 担当者 the person in charge 押田 浩文
 住所 address 〒114-0002 東京都北区王子 2-26-2-3F
 TEL 03-3919-5111 / FAX 03-3919-5114 / E-mail okudera@carrot.ocn.ne.jp
 取扱い製品（サービス） handling product（service） オーラルケアグッズ、インプラントケアグッズ、インスツルメント

企業名 company name 王子デンタルラボラトリー（奥寺医療ビル有限会社）
 担当者 the person in charge 顧客担当アソシエイト 佐藤 七施
 住所 address 〒114-0002 東京都北区王子 2-26-2-3F
 TEL 03-3919-5495 / FAX 03-3919-5114 / E-mail oji-dental.labo@outlook.jp
 取扱い製品（サービス） handling product（service） 歯科技工物全般

歯学雑誌・新聞 専門広告代理店

佐々木広告社は
このようなお客様の声にお応えします。



制作デザインも
できるの？ 料金は？

どんな雑誌や新聞に
出せば効果があるの？

今ある広告は内容がまったく良くない！
購買に結びつく広告がしたい！

どのように広告を出せば
よいのかわからない？



先ずはお電話ください。

www.sasaki-ad.co.jp



広告デザインからメディア・ミックスまでトータルでサポート！



有限会社佐々木広告社

〒113-0021 東京都文京区本駒込 1-11-5 TEL03-3944-1991 FAX03-3944-1982 E-mail: info@sasaki-ad.co.jp



(公社)日本口腔インプラント学会認定講習会 2018年度 受講生募集

公益社団法人 日本口腔インプラント学会の教育認定施設である東京形成歯科研究会では、平成 30 年 4 月に開講となる公益社団法人日本口腔インプラント学会認定講習会の受講生を募集中です。創立 36 周年を迎え、国内外で論文を発表する歯科界をリードする教育施設です。毎年認定講習会には、臨床系から学術系までの一流の講師陣を招聘し、歯科先端医療の講義・実習はもちろん、基礎から専門・応用編までを網羅した充実したカリキュラムを用意しております。専修医・専門医・指導医の取得に向けても、的確に丁寧に多彩な講師陣が対応いたします。

理事長・施設長・医学博士 奥寺 元

|受講期間| 2018年4月～2019年3月

**|会場| オクデラメディカル
インスティテュートセンター**
東京都北区王子2-26-2
[交通/JR・メトロ「王子駅」より徒歩約5分]

|定員| 20名 ※定員になり次第募集を締め切ります。

|受講料| 650,000円 ※実習器材・材料費別途 ※分割払い可能

[オンラインセミナー受講可能]* 補講*としてWeb上で受講できるシステムを用意しています。
※詳細は以下「お問合せ先」まで。

毎月1回・日曜日、年12回開催(内1回は土・日開催)

LIVE オペ ハンズオン (Hands-on) 解剖 実習 講義 講演

受講対象者

(公社)日本口腔インプラント学会認定
「専修医」「専門医」「指導医」
取得希望の歯科医師

「基本」から「専門・応用」まで
インプラントを勉強したい先生

常に最先端の医療情報・技術を
習得希望のベテラン歯科医師

2018年度 年間スケジュール ※予告なく、講演日程・内容、講師等が変更となる場合がございます。予めご了承ください。

2018年	古谷田 泰夫	〈古谷田歯科医院〉	【講義】	高齢者とインプラント治療～超高齢化社会に向けて～
4月15日(日)	藤井俊治	〈JSOI認定委員会副委員長〉	【講義】	JSOI専修医 専門医取得・更新/口腔内写真撮影
5月27日(日)	児玉 利朗	〈神奈川歯科大学付属横浜クリニックインプラント科教授〉	【講義】	インプラント周囲炎
	宮崎 隆	〈昭和大学 歯学部部長〉	【講義】	インプラント材料学
6月24日(日)	相澤 八大	〈あいざわ歯科クリニック〉	【講義】	ガイドサーージェリー
	川端 秀男	〈早稲田駅前デンタルクリニック〉	【講義】	骨移植の基礎と臨床
	江崎 友大	〈江崎デンタルクリニック〉	【講義】	補綴学
7月29日(日)	金田 隆	〈日本大学松戸歯学部放射線学講座教授〉	【講義】	基本から学ぶインプラント画像診断・実習
	月岡 庸之	〈日本大学松戸歯学部放射線学講座〉	【Hands-On】	
8月26日(日)	松尾 雅斗	〈神奈川歯科大学大学院口腔科学講座教授〉	【講義】	口腔解剖学
	宮崎 英隆	〈和歌山県立医科大学医学部形成外科科学講座講師〉	【講義】	外科基本手技(切開・縫合実習)
	奥寺俊允	〈王子歯科美容外科クリニック〉	【Hands-On】	
9月30日(日)	江俣 壮一	〈江俣歯科医院〉	【講義】	歯周病患者のインプラント治療
	調整中		【講義】	マイクロスコープを使用した保存治療
10月28日(日)	中村 雅之	〈中村歯科医院〉	【講義】	抜歯即時埋入インプラントをマスターする
			【Hands-On】	
11月18日(日)	月岡 庸之	〈日本大学松戸歯学部放射線学講座〉	【講義】	GBR
		〈(一社)東京形成歯科研究会 副会長〉	【Hands-On】	
12月15日(土)	奥寺俊允	〈王子歯科美容外科クリニック〉	【講義】	上顎洞底挙上術
	古澤利武	〈古沢歯科医院〉		
12月16日(日)	奥寺 俊允	〈(一社)東京形成歯科研究会 副会長〉	【Hands-On】	上顎洞底挙上術 PRF
2019年	福田 謙一	〈東京歯科大学口腔健康科学講座教授〉	【講義】	歯科麻酔学 有病者のインプラント治療
1月27日(日)	奥寺俊允	〈(一社)東京形成歯科研究会 副会長〉	【LIVEオペ】	ライブサーージェリー(インプラントオペ)
	渡辺 久	〈日本レーザー歯学会 理事長〉	【講義】	インプラント治療におけるレーザーの有効活用
2月24日(日)	河奈裕正	〈慶應義塾大学医学部歯科・口腔外科学教室 准教授〉	【講義】	インプラント外科 軟組織・硬組織マネジメント
			【Hands-On】	
3月17日(日)	川瀬 知之	〈新潟大学大学院医歯学総合研究科准教授〉	【基調講演】	歯科領域 再生医療 血液臨床応用 基礎編
	海外講師他	調整中	【基調講演】	歯科領域 再生医療 血液臨床応用 臨床編

2018年度 (公社)日本口腔インプラント学会認定講習会 受講申込書

以下の必要事項にご記入の上、下記(お問合せ先)内のE-mail アドレス 或いはFAX番号までご送信下さい。

後日、事務局よりご連絡させていただきますが、事務局より連絡がない場合は下記(お問合せ先)までお電話していただくようお願い申し上げます。

フリガナ				〒	-		
お名前				ご住所			
貴院名		E-mail		TEL	()	-	
				FAX	()	-	

お問合せ先



一般社団法人 東京形成歯科研究会 (厚生労働省認定 再生医療等委員会 公益社団法人 日本口腔インプラント学会 認定施設)
〒114-0002 東京都北区王子2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ 3F オクデラメディカル内 事務局 担当: 押田浩文
TEL 03-3919-5111 FAX 03-3919-5114 E-mail okudera@carrot.ocn.ne.jp
URL <http://www.tpdimplant.com/>



第3種 再生医療 提供サポート

PRP / PRGF / CGF / PRF

第3種 再生医療を患者様へ提供するには

平成26年11月25日に「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成25年法律第85号）」が施行され、多血小板フィブリンゲルPRF（CGF）や多血小板血漿（PRP、PRGF）を用いた治療を行うすべての医療機関に以下の通り“届出”及び“提出”が義務付けられました。「再生医療等提供計画」の“提出”につきましては、添付が義務付けられている「意見書」の発行を厚生労働省関東信越厚生局認定東京形成歯科研究会認定再生医療等委員会（認定番号：NB3150011）で対応します。また、書類作成等のサポートを国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB）で請け負います。“届出”及び“提出”のサポートを希望される医療機関は、下記までお問合せ下さい。“届出”及び“提出”をせずに再生医療の提供を行った場合、罰則が適用されます。



厚生労働省関東信越厚生局
認定再生医療等委員会
東京形成歯科研究会

「届出」及び「提出」は下記2つ

- ① 特定細胞加工物製造の届出 ② 再生医療等提供計画の提出



厚労省への
申請サポート



申請後のサポート
定期報告他



教育・指導
共同研究



ISBB 国際血液・幹細胞臨床応用会議

The International Society of Blood Biomaterials and Stem Cell Clinical Application

〒114-0002 東京都北区王子2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ3F オクデラメディカル内
TEL.03-3919-5111 / FAX.03-3919-5114 / E-mail: okudera@carrot.ocn.ne.jp



自己血由来の成長因子を用いた 再生療法

商品番号
DE124-S

全2巻20,000円+税
各巻10,000円+税
(送料別)

～PRFと自己トロンビンを使用したPRPの生成方法とその臨床応用～

監 修 奥寺元 D.D.S., Ph.D.

(国際血液再生臨床応用会議 ISBB 理事長 / 国際顎顔面美容口腔外科学術会議会長 / 日本口腔インプラント学会指導医)

実技・解説 奥寺俊允 D.D.S., Ph.D. (王子歯科美容外科クリニック / 日本口腔インプラント学会専門医)

協 力 (公)日本口腔インプラント学会認定施設 東京形成歯科研究会 / 株式会社オステムジャパン

商品番号
DE124-1
59min.

再生療法概論 / PRF, PRPの生成法



《成長因子を用いた再生治療:概論》

- インプラント治療における再生療法
- PRP (多血小板血漿) とは
- PRF (多血小板フィブリン) とは
- PRPとPRFの違いについて

《PRF, PRP, 自己トロンビンの生成法》

- PRF (多血小板フィブリン) の生成
- PRP (多血小板血漿) の生成
- 自己トロンビンの生成

最新! 開発者 Choukroun の PRF 生成プロトコル
皆さんにもできる PRF&PRP の生成法

商品番号
DE124-2
90min.

PRF&PRP及び自己トロンビンの臨床応用



《症例1: PRF応用の骨再生誘導療法(GBR)》 《症例2: 両側上顎洞底挙上術・前歯部抜歯即時埋入》

- | | |
|-----------------|----------------------|
| ■ 症例概要・治療計画について | ■ 症例概要・治療計画について |
| ■ PRFの生成 | ■ PRF&PRP及び自己トロンビン生成 |
| ■ 骨再生誘導療法 (GBR) | ■ 両側上顎洞底挙上術 |
| | ■ 前歯部抜歯即時埋入術 |

再生療法で
時代は変わる!



インプラント治療等における再生療法では、足場(自家骨・他家骨・異種骨・人工骨)、細胞(間葉系幹細胞・骨芽細胞等)、シグナル分子(成長因子・骨形成タンパク等)の組み合わせが成功の鍵となります。足場である骨移植材に細胞が入り込んでいきます。その細胞を引き寄せるシグナルとして成長因子が重要な働きを担っています。近年、この足場と成長因子の併用療法が臨床応用され、良好な結果を示しています。

そこでこのDVDでは、成長因子を用いた再生療法の概念、及び自己血から得られる安全なPRP(多血小板血漿)やPRF(多血小板フィブリン)の生成法とその臨床応用例を紹介しています。

正しい診査診断、術式の選択をし、骨造成を行う時に成長因子を併用すれば、早期の創傷治癒につながり患者の負担が軽減されます。これにより確実な骨再生が行われその後のインプラント治療につなげることができます。

【監修 奥寺元、実技・解説 奥寺俊允へのお問い合わせはお気軽に!】東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ 3F

OKUDERAMEDICAL オクデラメディカル TEL 03-3919-5111 FAX 03-3919-5114

～“再生医療新法”施行～

自己血液由来成長因子を用いた

再生医療製品 Line Up

新製品

Processing Products of Reproduction Material Line Up

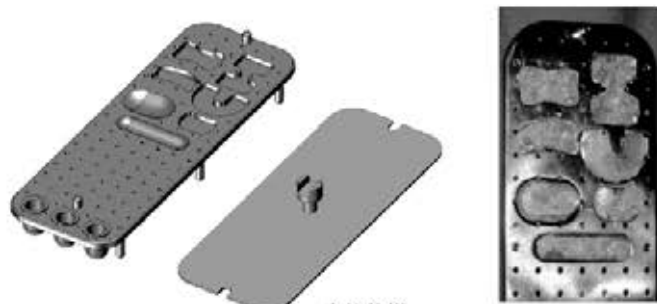
OKUDERA MEDICAL

Tissue Regeneration Material 3D Morphogenesis Device

組織再生物質3D形態形成器

術者の技量にかかわらず
組織再生物質の形態付与が可能

“Socket Preservation”にも対応



本体仕様
材質: ステンレス (SUS316)
寸法: 199mm x 69.5mm x 26mm
質量: 220g

販売価格: 120,000円 ※梱包・発送費、消費税別途

Simple Model Portable Clean Bench

簡易型ポータブルクリーンベンチ

(垂直気流型クリーンブース)

“法規制対応” リーズナブルな価格で
陽圧型キャビネットを提供



販売価格: 61,850円 ※梱包・発送費、消費税別途

OSTEO Crusher & Mini-barrel

骨・歯牙粉碎器 オステオクラッシャー&ボーンミルミニバレル φ1



医療機器届出番号: 09B2X00010000421
一般的名称: 歯科用インプラント手術器具

販売価格: 60,000円 ※梱包・発送費、消費税別途



小孔1mm 新型ミニバレルの開発



販売価格: 90,000円
※梱包・発送費、消費税別途

医療機器届出番号: 11B1X1000658D005
一般的名称: ボーンミル

※上記製品は、注文状況により、販売価格が変更となる場合があります。注文受付時、詳細をご説明させていただきます。



自己血由来の成長因子を用いた再生療法

～PRFと自己トロンビンを使用したPRPの生成方法とその臨床応用～

監修: 奥寺 元 D.D.S., Ph.D. / 実技・解説: 奥寺 俊允 D.D.S., Ph.D.

○商品番号DE124-1 (59min.) 再生療法概論/PRF, PRPの生成法

○商品番号DE124-2 (90min.) PRF&PRP及び自己トロンビンの臨床応用

販売価格: 各10,000円 ※梱包・発送費、消費税別途

Leaflet For Patient Explanation ※患者説明用

各医院名入り組織再生治療 A4判 三つ折 リーフレット



患者様に対して、歯科・再生治療について容易に説明することができる、サイズもコンパクトで便利なツールです。リーフレット内の各所に貴院名を掲載して印刷致します。

販売価格: 100部 10,000円
※梱包・発送費、消費税別途

歯科・再生医療

“厚労省への各種届け出” サポート
「再生医療等安全性確保法」について

2014年11月25日、「再生医療等安全性確保法」施行。患者の血液を採取し、遠心分離して作製される自己血液由来のPRP, PRF, PRGFは上記・法律の対象となり、それらを実施している医療機関は厚生労働省各地方厚生局への各種届出等が義務付けられました。私どもは、その届出等のサポートさせていただきます。詳細は以下まで、お問合せ下さい。

OKUDERA MEDICAL

販売元 オクデラメディカルグループ

〒114-0002 東京都北区王子2-26-2ウェルネスオクデラビルズ3F
一般社団法人東京形成歯科研究会事務局・東京形成歯科研究会再生医療等委員会事務局 併設
TEL: 03-3919-5111 FAX: 03-3919-5114 Email: okudera@carrot.ocn.ne.jp

より早く簡便に効果的 インプラント関連インスツルメント オクデラ式インプラントインスツルメント

New

サイナスリフター

商品番号 #001

品名／奥寺式 サイナスリフト インスツルメント

製造元：(株)YDM

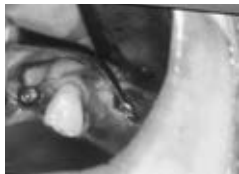
“これ1本で行える万能サイナスリフター”



スナイダー粘膜剥離子の Head 部は、初期剥離に容易な卵形で大きさは、5mm・9mm として、Shank 部は、頬が影響されず、また洞内挿入が容易な彎曲の 60° として、近心部すなわち鼻腔犬歯窩側と遠心部上顎結節部迄挿入が容易な長さとし、複雑なインスツルメントを応用しなくても万能な形態としました。



ウィンド形成後追打



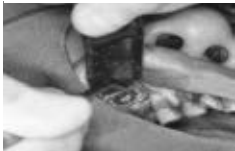
サイナスリスターを初期挿入



任意な方向に剥離



他症例の初期挿入



スナイダー膜と骨の間に挿入し剥離



任意な方向に挿入

セーフティー・マルチ抜糸シザーズ



- 刃先に丸みを付け、尖鋭剪刀より組織に優しい抜糸ができる
- 片側鍵型にて、迅速・確実に糸を拾い・切断が可。(切断後の糸も保持)
- 全長 15 cm で深部迄届く
- スリムな形状で狭い術野に挿入・使用可
- 切断と除去を同時に併用でき時間短縮

即時埋入用エレベーター 商品番号 #002

品名／奥寺式ペリオトームセット 製造元：(株)YDM



歯根側の歯槽空隙に挿入し、歯槽骨を破損させないように歯根膜を断裂させながら歯牙を動揺させ、抜歯を行いその後、抜歯窩にドリリング後インプラントを埋入します。動揺抜歯のためのエレベーターである。



最初、近心スペースの歯根膜に挿入し、歯根膜を断裂後、歯槽骨を破損しないようにエレベーター作用を行います。



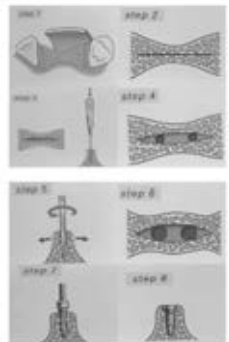
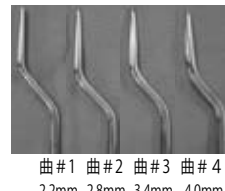
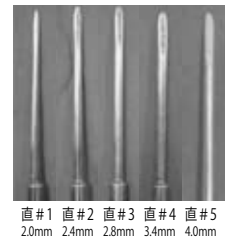
また同様に遠心部にも挿入し、充分動揺が起きたら撤去します。

ボンスプレッディングシステム 商品番号 #003

品名／奥寺式歯槽骨拡大インプラント窩形成器

医療用具許可番号 09BZ0011 号

製造元：(株)YDM



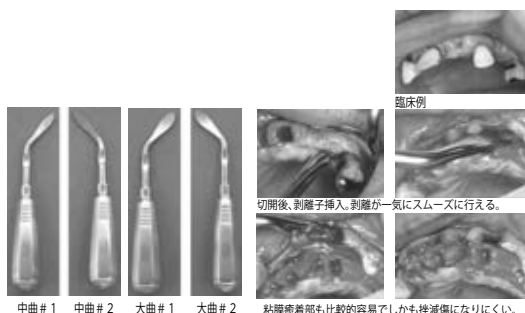
粘膜骨膜剥離子 商品番号 #006

品名／オクデラ式剥離子 4 本組

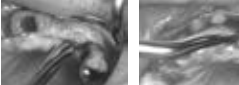
製造元：(株)YDM

医療用具許可番号 11BZ0131 号

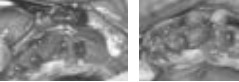
癒着した粘膜や大きく粘膜を剥離するには、従来型では時間と組織のダメージを支えます。人間工学的立場が考案した剥離子。その形態を Head と Handle に分け、先端部は、鋭利な刃をつけて蕾状とした。Head は 60° のアングルを与え、刃は左右につけ、容易な剥離が可能です。また、尖頭を蕾状の形態とした。その材質は、硬質ステンレスを用いました。



臨床例



切開後、剥離子挿入、剥離が一気にスムーズに行える。

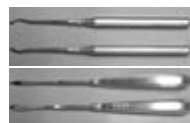


粘膜癒着部も比較的容易でしかも挫減傷になりにくい。

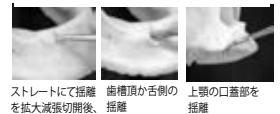
フェイスリフター 商品番号 #004

品名／奥寺式 歯槽骨頂骨膜剥離子

医療用具許可番号 11BZ0131 号



小曲 #2 粘膜炎下で骨補充材を間移入することにより歯槽骨幅や高さの拡大を行い、インプラントの埋入と共にフェイスリフトを行うものです。ストレートの大小の剥離子により、歯槽骨頂から口蓋・舌側の剥離を容易に剥離し、骨面にフィットさせる形態です。左右に分けられており操作が容易です。



ストレートにて歯槽骨を拡大減圧切開後、揺離 歯槽頂が舌側の揺離 上唇の口蓋部を揺離

オステオクラッシャー 商品番号 #005

品名／奥寺式 採取骨片粉碎器 医療用具許可番号 09BZ0011 号

製造元：(株)シオダ

自家骨応用のボーンオギメンテーションは安全で確実に骨造成ができると言われています。オステオクラッシャーは小骨片を対象に骨粉砕を容易にします。GBR や GTR など臨床の応用は II の幅を広げることができます。



サージカルステント 商品番号 #007

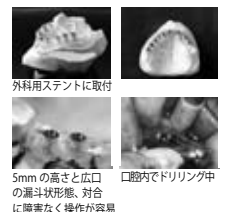
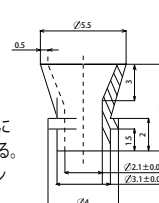
品名／奥寺式 ドリリング挿入ガイド 製造元：(株)YDM

医療用具許可番号 11BZ0131 号



直径 5mm、高さ 5mm、広口の漏斗状

手術を迅速と的確に行える器材は、手術時間の延長に終む苦痛と創傷治癒と長期保存に関係すると思われる。初期のドリリングを的確に容易に行えるサージカルステント。



外科用ステントに取付

5mm の高さで広口の漏斗形状で、対応に障害なく操作が容易



【お問合せ・資料請求】

OKUDERA MEDICAL

〒114-0002 東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ 3 F

TEL : 03-3919-5111 FAX : 03-3919-5114 E-mail : okudera@carrot.ocn.ne.jp



Article

An Evaluation of the Accuracy of the Subtraction Method Used for Determining Platelet Counts in Advanced Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factor Preparations

Taisuke Watanabe ¹, Kazushige Isobe ¹, Taiji Suzuki ¹, Hideo Kawabata ¹, Masayuki Nakamura ¹, Tsuneyuki Tsukioka ¹, Toshimitsu Okudera ¹, Hajime Okudera ¹, Kohya Uematsu ², Kazuhiro Okuda ³, Koh Nakata ⁴ and Tomoyuki Kawase ^{5,*}

¹ Tokyo Plastic Dental Society, Kita-ku, Tokyo 114-0002, Japan; watatai@mui.biglobe.ne.jp (T.W.); kaz-iso@tc4.so-net.ne.jp (K.I.); drtaiji1116@yahoo.co.jp (T.S.); hidei@eos.ocn.ne.jp (H.K.); maoh4618@me.com (M.N.); ugk64590@nifty.com (T.T.); toshiokuderaphd@gmail.com (T.O.); okudera@carrot.ocn.ne.jp (H.O.)

² Division of Implantology, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata 951-8514, Japan; ue@dent.niigata-u.ac.jp

³ Division of Periodontology, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata 951-8514, Japan; okuda@dent.niigata-u.ac.jp

⁴ Bioscience Medical Research Center, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata 951-8520, Japan; radical@med.niigata-u.ac.jp

⁵ Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata 951-8514, Japan

* Correspondence: kawase@dent.niigata-u.ac.jp; Tel.: +81-25-262-7559

Academic Editor: Louis M. Lin

Received: 21 November 2016; Accepted: 6 January 2017; Published: 12 January 2017

Abstract: Platelet concentrates should be quality-assured of purity and identity prior to clinical use. Unlike for the liquid form of platelet-rich plasma, platelet counts cannot be directly determined in solid fibrin clots and are instead calculated by subtracting the counts in other liquid or semi-clotted fractions from those in whole blood samples. Having long suspected the validity of this method, we herein examined the possible loss of platelets in the preparation process. Blood samples collected from healthy male donors were immediately centrifuged for advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) and concentrated growth factors (CGF) according to recommended centrifugal protocols. Blood cells in liquid and semi-clotted fractions were directly counted. Platelets aggregated on clot surfaces were observed by scanning electron microscopy. A higher centrifugal force increased the numbers of platelets and platelet aggregates in the liquid red blood cell fraction and the semi-clotted red thrombus in the presence and absence of the anticoagulant, respectively. Nevertheless, the calculated platelet counts in A-PRF/CGF preparations were much higher than expected, rendering the currently accepted subtraction method inaccurate for determining platelet counts in fibrin clots. To ensure the quality of solid types of platelet concentrates chairside in a timely manner, a simple and accurate platelet-counting method should be developed immediately.

Keywords: fractionation; platelets; platelet-rich fibrin; concentrated growth factors; quality assurance; regenerative therapy

1. Introduction

Ever since platelet-rich plasma (PRP) was reported to be effective for skeletal regeneration in sinus floor elevation [1], PRP and its other subsequently developed derivatives, all of which can

be designated as “platelet concentrates”, have been widely applied as a source of growth factors in various fields of regenerative therapy. In the fields of periodontology and maxillofacial surgery, platelet-rich fibrin (PRF), a PRP derivative, has increasingly been used for treatment of hard and soft tissues [2–5]. In terms of their preparation, the principle behind the fractionation of blood cell components remains misunderstood and actual counts of the components may be overestimated. Centrifugal fractionation is the most efficient method available for separating particles of different specific gravities and sizes. However, because blood cells are not ideally spherical or mechanically stiff, they cannot be clearly fractionated according to their specific gravity and size. Among most clinicians involved in regenerative therapy, it has nevertheless been generally accepted that platelets are highly concentrated in the buffy coat and are hardly present in other neighboring fractions, especially the red blood cell (RBC) fraction, after centrifugal fractionation.

This misunderstanding is not limited to the efficiency of evaluating platelet concentrations in liquid samples but can be expanded to the evaluation of platelet counts in self-clotted platelet concentrates, such as advanced-platelet-rich fibrin (A-PRF) and concentrated growth factors (CGFs). Since platelets have no nuclei, their counts cannot be determined by DNA contents. Therefore, to determine platelet counts in fibrin clots, a “subtraction method” is currently applied for the calculation [6–9]. According to this method, the platelet counts contained in fibrin clots are calculated by subtracting those in the clot exudate, the supernatant serum, and the RBC fraction (i.e., the red thrombus) from those in the starting whole blood sample. However, this method does not consider the possibility of platelet contamination in the RBC fraction or the possible loss and damage of platelets during processing for cell counting.

Therefore, we have long suspected the validity of this method. To assure the quality of platelet concentrates, the purity and identity, at least, should be evaluated in each preparation prior to clinical use, as described in the guidelines for major advanced therapeutic medicinal products [10,11]. To evaluate the possible contamination and loss of platelets in the preparation process in self-clotted platelet concentrates, in this study, we examined the distribution of platelets and white blood cells (WBCs) after fractionation by the centrifugal protocols recommended for their preparation. From the results, we found that the subtraction method is not appropriate for the accurate quantification of platelets in fibrin clots.

2. Results

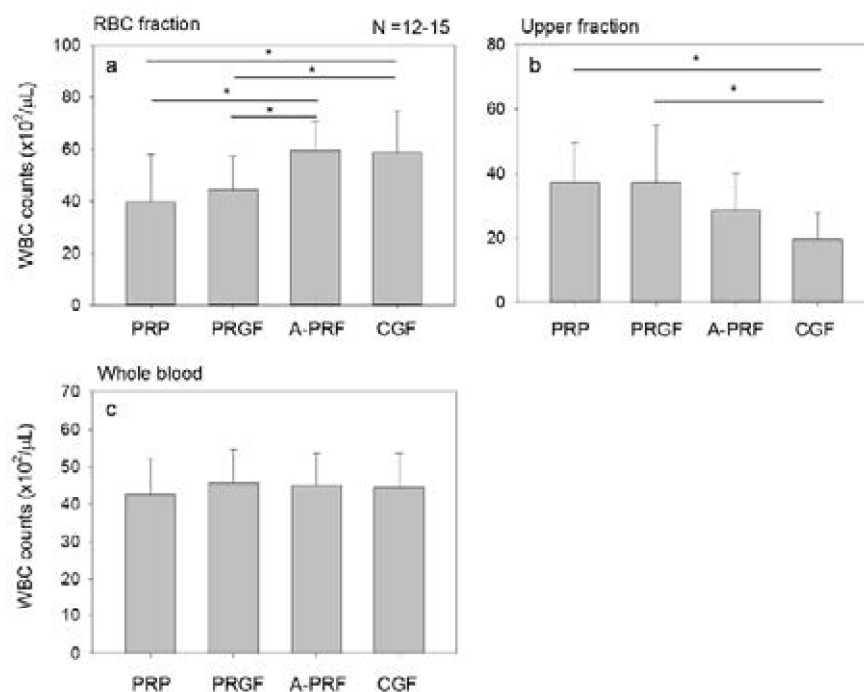
The appearances of the samples in the presence of the anti-coagulant after fractionation under the indicated centrifugal conditions are shown in Table 1. The buffy coat, a thin white line just above the RBC fraction, was somewhat more clearly formed by high-speed centrifugation using a swing rotor, which is recommended for the 1st spin of PRP preparation. In contrast, the low-speed centrifugation recommended for A-PRF preparation could not clearly fractionate RBCs, which were, to some extent, diffused into the upper plasma fraction.

The WBC distributions of the fractionated samples are shown in Figure 1. Whole blood samples containing the anti-coagulant were centrifuged by the indicated protocols as in Table 1. WBC counts (i.e., concentration) in the RBC fraction were significantly higher in the A-PRF/CGF-simulation models than in the PRP/plasma rich in growth factors (PRGF)-simulation models, whereas those in the upper fraction tended to be lower in the A-PRF/CGF-simulation models. The common factors of the A-PRF- and CGF-simulation models were the use of glass tubes and an angle rotor, but not the centrifugal force.

Table 1. Centrifugal conditions for preparation of four platelet concentrate types and the resulting fractions.

Centrifugation	PRP	PRGF	A-PRF	CGF
Force (g)	1100	580	200	692
				547
				592
				855
Duration (min)	8	8	8	2
				4
				4
				3

Appearance of ACD-A-contained blood samples

**Figure 1.** WBC counts in the RBC fraction (a), upper plasma fraction (b), and whole blood sample (c). Peripheral blood samples were collected in the presence of the anti-coagulant and centrifuged by the individual centrifugation protocols. The upper fraction was collected above the line indicated in Table 1. The remainder of the fractionated sample was used as the RBC fraction. N = 12–15. The asterisks represent statistically significant difference ($p < 0.05$).

Platelet distributions in the fractionated samples are shown in Figure 2. Whole blood samples were fractionated as in Table 1. Platelet counts in the RBC fraction were relatively lower in the PRGF-simulation model. Instead, those in the upper fraction were significantly higher in both the PRGF- and the A-PRF-simulation models than that of the PRP- and CGF-simulation models. Both the PRGF- and A-PRF-simulation models adopted relatively low-speed centrifugation.

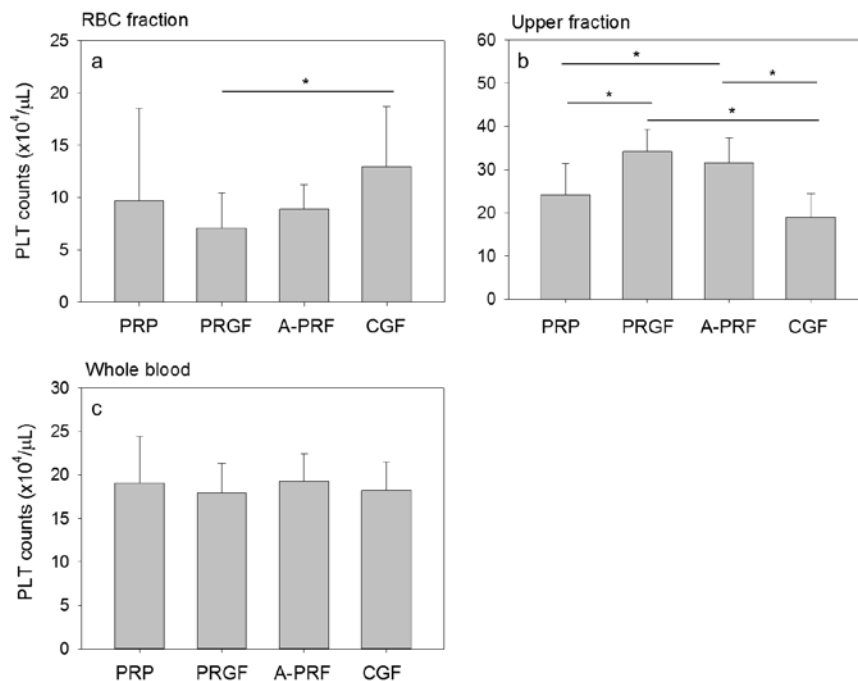


Figure 2. Platelet (PLT) counts in the RBC fraction (a), upper plasma fraction (b), and whole blood sample (c). Peripheral blood samples were collected in the presence of the anti-coagulant and centrifuged by the individual centrifugation protocols. The upper fraction was collected above the line indicated in Table 1. The rest of the fractionated sample was used as the RBC fraction. N = 12–15. The asterisks represent statistically significant difference ($p < 0.05$).

To demonstrate similarity, WBC and platelet distributions in the self-clotted A-PRF/CGF preparations were examined. As shown in Figure 3, in the A-PRF/CGF prepared from the blood samples collected in the absence of the anti-coagulant, both apparent WBC and platelet counts in the sum of the RBC and exudate fractions were substantially lower than those in the whole blood samples. As a result, the calculated WBC and platelet counts in the clotted A-PRF/CGF fractions were extraordinarily higher than those in the other fractions. These findings indicate that, unlike those in the upper fractions obtained in the presence of the anti-coagulant, both WBCs and platelets are evaluated to be concentrated predominantly in the A-PRF/CGF clots by the subtraction method according to the Formula (1) described in the Materials and Methods section.

To detect platelets in the red thrombus, the upper region of the red thrombus, indicated by the yellow dot square that is approximately 2 mm below the cutting edge in the upper left panel of Figure 4, was dissected and washed three times with PBS to remove RBCs loosely trapped by fibrin meshwork of the clot. Platelet aggregation in the upper region of the red thrombus is shown in the lower panel of Figure 4. In contrast to RBCs, WBCs and platelets seemed to tightly attach to fibrin fibers, and platelet aggregates were found almost everywhere on the surface of this region.

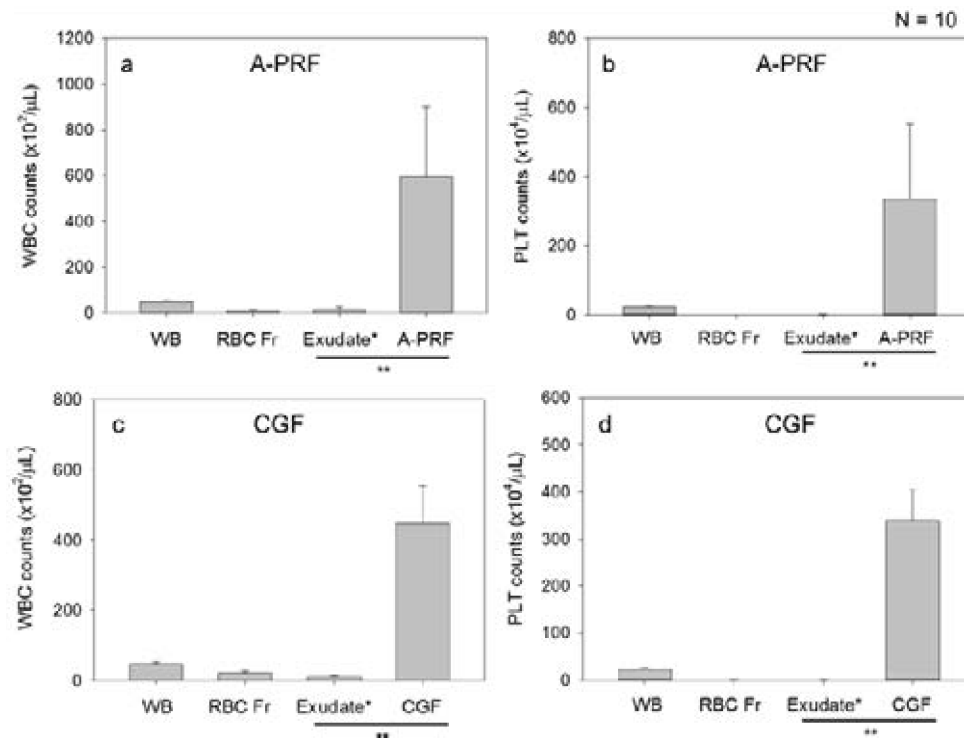


Figure 3. WBC (a,c) and platelet (PLT) counts (b,d) in the A-PRF (a,b) and CGF preparations (c,d). Peripheral blood samples were collected into glass tubes in the absence of the anti-coagulant and centrifuged by the individual centrifugation protocols. The freshly formed fibrin clots were withdrawn and dissected from the RBC clots. The resulting A-PRF/CGF preparations were compressed to collect the exudate fractions, whereas the RBC clots were minced and gently combined with the liquid form of RBC fraction. WBC and platelet counts were determined in the whole samples, A-PRF/CGF exudate fraction, and RBC fractions. Calculated WBC and platelet counts in the A-PRF/CGF preparations, which were calculated by the subtraction method, were substantially greater than that of the other fractions. N = 10. * The exudate fraction also included a small volume of the acellular serum fraction. ** Sum of these fractions corresponds to the upper plasma fraction shown in Table 1.

The possible loss of platelets during collection and centrifugation was then examined. The number of WBCs and platelets that tightly adhered to the inside wall of the glass tubes is shown in Figure 5. In the glass tubes recommended for A-PRF preparations (A-PRF+[®]), as well as in plastic tubes (Neotube[®]) (data not shown), washing with PBS three times thoroughly removed almost all of the potentially attached WBCs and platelets. In contrast, a significant number of WBCs and platelets were detected in the glass tubes usually used for the preparation of CGF (Vacutainer tube[®]). These findings indicate that, possibly because of insufficient or absent surface siliconization or other coating, particular types of glass tubes, such as the Vacutainer tube[®], allow WBCs and platelets to tightly adhere to their inside walls along with a more efficient induction of clotting.

To confirm this observation, the basic ability of platelet's adhesion to plastic and glass labware and RBC was examined using SEM. As shown in Figure 6, platelets adhered to polystyrene culture dishes and glass coverslips within 10 min. Some platelets emitted pseudopodia, whereas others were spread to form flatten disks. In contrast, in the lid of a plastic culture dish that is not modified for better cell affinity, most platelets appeared in a resting state. Furthermore, in the presence of RBCs, some platelets were found to attach to RBCs by their pseudopodia, as indicated by the dotted-line circle.

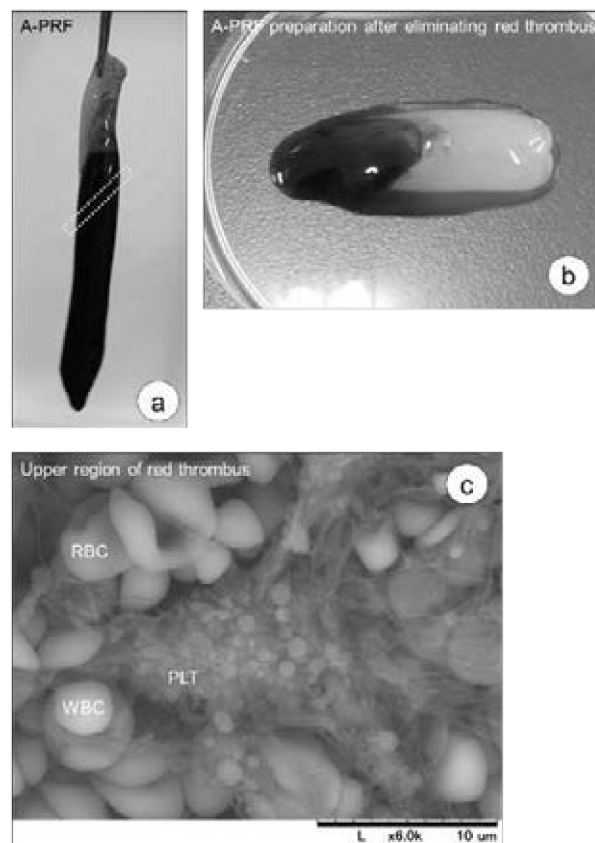


Figure 4. (a) Appearance of the A-PRF clot prepared using a centrifuge equipped with an angle rotor and the recommended glass tube. (b) The A-PRF preparation with a small portion of the red thrombus was prepared by scrapping off most of the red thrombus. (c) The region indicated by the yellow dot-square was subjected to examination by Scanning Electron Microscopy (SEM). In the CGF preparation, the red thrombus was usually shorter than that of the A-PRF preparation. SEM observations of aggregated platelets in the upper region of the RBC clot formed just below A-PRF preparations. Similar findings were obtained in the preparation of CGF. Bar = 10 μm.

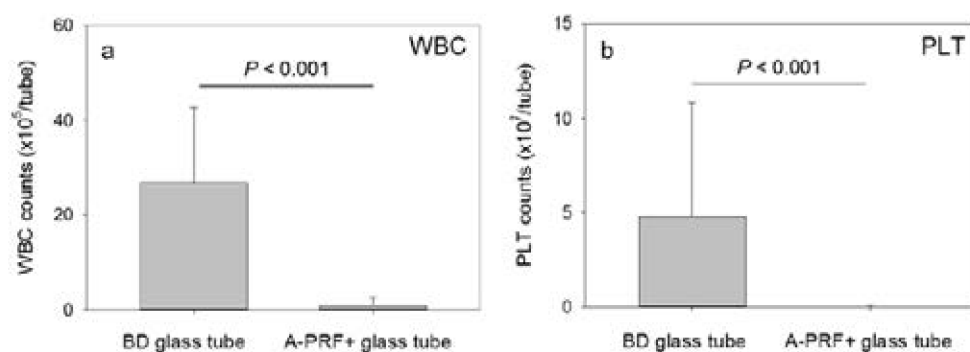


Figure 5. WBC (a) and platelet counts (b) on the inside wall of two types of glass tubes. After the A-PRF/CGF clots prepared in the absence of the anti-coagulant were removed, the inside of the tubes were washed thoroughly. WBCs and platelets were enzymatically detached for counting. N = 8 (A-PRF+[®]) or 12 (Vacutainer tube[®]).

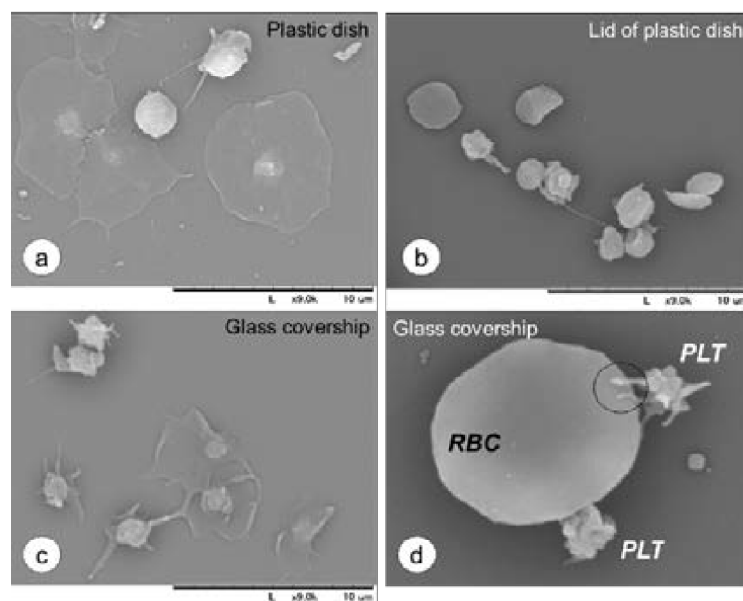


Figure 6. SEM observations of platelets on cell culture wares in the absence or the presence of RBCs. Washed platelets suspended in Hepes–Tyrode solution were placed on plastic dishes (a), hydrophobic lids of plastic dishes (b) or glass coverslips (c) and incubated for 10 min at 37 °C. As above, RBC-contaminated platelet suspensions were plated on the coverslip and incubated (d). Data is representative of three independent experiments. Bar = 10 μm.

3. Discussion

In general, as the centrifugal force increases, the volume of the RBC fraction becomes smaller, whereas that of the upper fraction becomes larger. It should be noted that this phenomenon by itself provides the background influencing blood cell counts, i.e., blood cell concentration, in each fraction. Under these conditions, WBC counts did not appear to be significantly influenced by the centrifugal force. Centrifugation using an angle rotor and glass tubes, regardless of centrifugal force, significantly increased WBC counts in the RBC fraction, whereas the WBC counts in the upper plasma fraction were decreased. In contrast, platelet counts were apparently influenced by centrifugal force; they were increased in the upper plasma fraction by low speed centrifugation, whereas those in the RBC fraction were decreased.

The main purpose of this study was to validate the currently accepted method of determining platelet counts in fibrin clots. The current method involves subtracting the platelet counts in the RBC, supernatant “acellular” serum, and A-PRF/CGF exudate fractions from those in the whole blood sample [6–9]. However, given that platelets easily aggregate upon activation and adhere to glass/plastic/metal surfaces, we have suspected that platelet counts can be determined accurately by cell counting in the liquid/semi-clotted fractions after multiple steps and subsequent calculation.

In this study, we demonstrated that platelets easily and rapidly attach to both glass and plastic surface optimized for cell adhesion. However, platelets appeared not to attach to hydrophobic plastic surface. Judging from the disclosed manufacturers’ information and research investigators’ data [12], it is thought that the inside wall of blood collection tubes is generally, but not invariably, coated with silicon or similar agents to prevent cell adhesion. Therefore, possible platelet adhesion to the inside wall of the tube may be low and insignificant. On the other hand, loss by platelet adhesion to the stainless-steel compression device or dry gauze and damage during compression to squeeze exudates should be considered as demonstrated in the previous study [13].

However, we would indicate that the contamination of platelets in the RBC fraction, i.e., the red thrombus is the major factor causing miscalculation of platelet counts. The scheme of migration of major blood components during centrifugation is illustrated in Figure 7. Owing to their deformability

and Fe^{2+} -dependent high specific gravity, although smaller in size than large WBCs, RBCs spin-down faster. Specific binding and mechanical interaction, to some extent, cause RBCs to bring platelets into the RBC fractions, as demonstrated in previous studies [14,15]. WBCs and platelets spin-down essentially depending on their size. However, if aggregated, platelets would spin-down faster than WBCs. Conversely, the fibrin clot captures blood cells, especially platelets and WBCs, and tends to rise to the upper surface by buoyant force. These reactions are synchronized to form A-PRF/CGF clots.

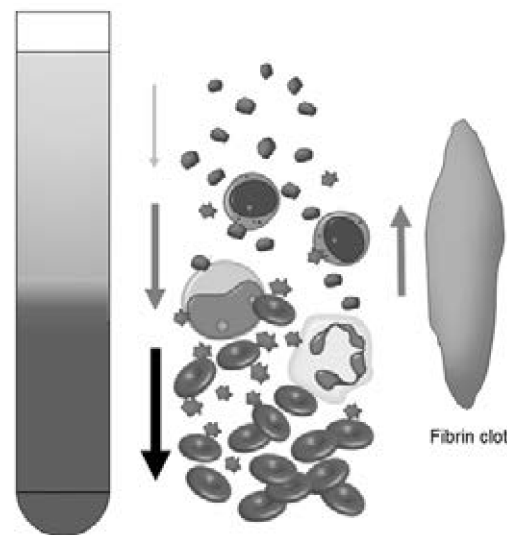


Figure 7. Scheme of migration of major blood components during centrifugation.

To release possibly contaminating platelets and WBCs and determine their counts more accurately, we did mince the red thrombus using scissors; however, the resulting platelet counts were much lower than those in the RBC fraction in the presence of the anti-coagulant. Taken together with the finding that platelet aggregation was actually detected in the red thrombus, it should be noted that a significant number of platelets is included in the red thrombus and isolated from subsequent calculation.

As for possible alternatives, the measurement of PDGF, a major growth factor produced in platelets, may provide data that enables estimation of platelet counts. However, because the ELISA method is time-consuming, the measurement of PDGF is not appropriate for quality assurance of A-PRF/CGF preparations prior to clinical use in case of on-site preparation. Therefore, other accurate methods that enable us to directly count platelets should be developed to assure the quality of A-PRF/CGF preparations.

4. Materials and Methods

4.1. PRP and PRGF Preparation

In a previous article [16], we literally compared PRP and other PRP derivatives and concisely described the difference of their characteristics.

As previously described [17–19], blood samples (~9.0 mL) were collected in the presence of acid citrate dextrose solution-A formulation (ACD-A; Terumo, Tokyo, Japan), an anti-coagulant, using plastic vacuum blood collection tubes (Neotube®; NIPRO, Osaka, Japan) equipped with 21-gauge needles from healthy, non-smoking volunteers (nine males; 28 to 71 years old). As listed in Table 1, to obtain the PRP (1st spin of the double-centrifugation protocol) and PRGF preparations, the blood samples were centrifuged using a KS-5000 centrifuge (Kubota, Tokyo, Japan) equipped with a swing rotor at 2480 rpm ($1100 \times g$) and 1800 rpm ($580 \times g$), respectively, at 25 °C for 8 min.

The study design and consent forms for all procedures performed within the study subjects were approved by the ethical committee for human subjects at Niigata University School of Medicine in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2008.

4.2. Simulation of A-PRF and CGF Preparation in the Presence of the Anti-Coagulant

As described previously [13,20,21], blood samples (~9.0 mL) were collected with ACD-A, using conventional glass vacuum blood collection tubes (Vacutainer tube®; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), from the same donors, and were immediately centrifuged using a Spectrafuge 6C® centrifuge (Labnet International Inc., Edison, NJ, USA) equipped with an angle rotor or a Medifuge® centrifugation system (Silfradent S. r. l., Santa Sofia, Italy) according to the protocol for preparation of A-PRF or CGF, respectively. The centrifugal conditions are listed in Table 1.

4.3. Preparation of A-PRF and CGF in the Absence of the Anti-Coagulant

For preparation of the A-PRF and CGF, the recommended glass vacuum blood collection tubes, A-PRF+® (Jiangxi Fenglin Medical Technology Co. Ltd., Fengcheng, China) and Vacutainer tube® were used, respectively. Blood samples were collected without the anti-coagulant and immediately centrifuged under the conditions listed in Table 1.

4.4. Determination of Blood Cell Counts

The number of blood cells in the initial whole blood and fractionated liquid samples were determined using an automated hematology analyzer (pocH-100iV diff; Sysmex, Kobe, Japan). First, RBCs, WBCs, and platelets were counted immediately after blood collection. Second, freshly prepared fractions in the presence of the anti-coagulant were immediately evaluated for blood cell count. To maximize the collection of platelets, the border between the RBC fraction and upper plasma fraction was established as 1 mm below the apparent border between these fractions (see Table 1).

To determine WBC and platelet counts in the absence of the anti-coagulant, after centrifugation, the supernatant serum fraction, if any, was collected first. Then, the resulting clot was removed, and the semi-clotted, or loosely-clotted, red thrombus was scrapped off, using dental tweezers, from the upper fibrin clot approximately 1 mm below the apparent border (Table 1, Figure 5). The resulting fibrin clot was then compressed using a PRF compressor [13] to squeeze the fibrin clot exudate. The RBC clot was minced with scissors and gently mixed by inverting the tube several times. Each fraction was subjected to cell counting using the hematology analyzer. Platelet and WBC counts in the fibrin clot were determined by subtracting those counts in the RBC, supernatant serum, and A-PRF/CGF exudate fractions from those counts in the anti-coagulant-free whole blood sample, as calculated according to the following Formula (1).

$$\begin{aligned} (\text{PLTs/WBCs in fully clotted A-PRF/CGF preparations}) = & (\text{PLTs/WBCs in liquid WB}) - \\ & [(\text{PLT/WBCs in semi-clotted RBC fraction}) + (\text{PLTs/WBCs in liquid serum}) + \\ & (\text{PLTs/WBCs in liquid exudate fraction})], \end{aligned} \quad (1)$$

To determine the numbers of WBCs and platelets attached to the inside wall of the tubes, after removing the clots and other liquid fractions, the tube was washed thoroughly with PBS three times, and tightly adherent WBCs and platelets were detached with 0.05% trypsin plus 0.53 mM EDTA (Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) with gentle agitation for 5 min. Cell suspensions were directly subjected to cell counting.

4.5. Scanning Electron Microscopy (SEM)

To detect platelets in the upper region of the red thrombus, the region below the border, which is indicated by a yellow dot-square in Figure 4, was dissected, washed in PBS three times, fixed with 2.5% glutaraldehyde, dehydrated with a series of ethanol and t-butanol washes, freeze-dried, and then

examined by SEM (TM-1000, Hitachi, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 15 kV, as described previously [22]. Aggregated platelets were microscopically examined, but not counted.

To observe platelet morphology on cell culture wares, the PRP was prepared as described previously [17,23], and the platelets were washed with a 10 mM Hepes–Tyrode buffer (pH 7.4), suspended in a Hepes–Tyrode buffer containing 100 ng/mL prostaglandin E1 (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA), and stored while gently stirring with a rotator at ambient temperature until used, usually within 2 days. Platelets were placed on plastic dishes, lids of plastic dishes, or glass coverslips for 10 min at 37 °C. Then, platelets were fixed and prepared for examination by SEM.

4.6. Statistical Analysis

The data are reported as the mean value $\pm$ standard deviation (S.D.). For multi-group comparisons, statistical analyses were performed to compare the mean values by one-way analysis of variance (ANOVA) (SigmaPlot 12.5; Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). When the data did not pass the normality test, Dunn's (for platelet counts in the RBC fraction) or Tukey's multiple comparison tests were performed. *p*-values < 0.05 were considered significant.

5. Conclusions

Significant numbers of platelets are present in the RBC portion of fractionated whole blood at greater levels than expected, especially after centrifugation with a higher centrifugal force. In the absence of the anti-coagulant, platelets are aggregated on fibrin meshwork of the red thrombus and cannot be easily released for counting. Therefore, it is suggested that the current subtraction method is not appropriate for the determination of platelet counts in clotted A-PRF/CGF preparations. An accurate, direct, simplified method should be developed immediately to help the quality assurance of A-PRF/CGF preparations for clinical use.

Author Contributions: Taisuke Watanabe and Tomoyuki Kawase conceived and designed the study, performed the experiments, and wrote the manuscript; Kazushige Isobe, Taiji Suzuki, Hideo Kawabata, Masayuki Nakamura, Tsuneyuki Tsukioka, Toshimitsu Okudera and Kohya Uematsu performed the experiments and data analysis; Hajime Okudera, Kazuhiro Okuda and Koh Nakata participated in manuscript preparation. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Marx, R.E.; Carlson, E.R.; Eichstaedt, R.M.; Schimmele, S.R.; Strauss, J.E.; Georgeff, K.R. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontol.* **1998**, *85*, 638–646. [CrossRef]
2. Castro, A.B.; Meschi, N.; Temmerman, A.; Pinto, N.; Lambrechts, P.; Teughels, W.; Quirynen, M. Regenerative potential of Leucocyte- and Platelet Rich Fibrin (L-PRF). Part B: Sinus floor elevation, alveolar ridge preservation, and implant therapy. A systematic review. *J. Clin. Periodontol.* **2016**. [CrossRef]
3. Castro, A.B.; Meschi, N.; Temmerman, A.; Pinto, N.; Lambrechts, P.; Teughels, W.; Quirynen, M. Regenerative potential of leucocyte- and platelet-rich fibrin. Part A: Intra-bony defects, furcation defects and periodontal plastic surgery. A systematic review and meta-analysis. *J. Clin. Periodontol.* **2016**. [CrossRef] [PubMed]
4. Hehn, J.; Schwenk, T.; Striegel, M.; Schlee, M. The effect of PRF (platelet-rich fibrin) inserted with a split-flap technique on soft tissue thickening and initial marginal bone loss around implants: Results of a randomized, controlled clinical trial. *Int. J. Implant Dent.* **2016**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
5. Okuda, K.; Nakajima, Y.; Kawase, T.; Kobayashi, M.; Kamiya, M.; Wolff, L.; Yoshie, H. Platelet-rich fibrin membrane combined with beta-tricalcium phosphate for treatment of infrabony defects in chronic periodontitis: A case series. *Jacobs J. Dent. Res.* **2015**, *2*. [CrossRef]
6. Dohan Ehrenfest, D.M.; Del Corso, M.; Diss, A.; Mouhyi, J.; Charrier, J.B. Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J. Periodontol.* **2010**, *81*, 546–555. [CrossRef] [PubMed]

7. Aggarwal, A.; Singhal, N. Evaluation of content and distribution of platelets in platelet rich fibrin at various centrifugation time periods: A light microscopic study. *Int. J. Dent. Med. Res.* **2015**, *1*, 61–64.
8. Eren, G.; Gurkan, A.; Atmaca, H.; Donmez, A.; Atilla, G. Effect of centrifugation time on growth factor and MMP release of an experimental platelet-rich fibrin-type product. *Platelets* **2016**, *27*, 427–432. [CrossRef] [PubMed]
9. Peck, M.; Hiss, D.; Stephen, L.; Satti, A.; Majeed, A. Platelet-rich fibrin (PRF)—The effect of storage time on platelet concentration. *South Afr. Dent. J.* **2015**, *70*, 448–451.
10. Radrizzani, M.; Lo Cicero, V.; Soncin, S.; Bolis, S.; Surder, D.; Torre, T.; Siclari, F.; Moccetti, T.; Vassalli, G.; Turchetto, L. Bone marrow-derived cells for cardiovascular cell therapy: An optimized GMP method based on low-density gradient improves cell purity and function. *J. Transl. Med.* **2014**, *12*. [CrossRef] [PubMed]
11. Rayment, E.A.; Williams, D.J. Concise review: Mind the gap: Challenges in characterizing and quantifying cell- and tissue-based therapies for clinical translation. *Stem Cells* **2010**, *28*, 996–1004. [PubMed]
12. McKiel, R.R.; Barron, N.; Needham, C.J.; Wilkins, T.A. Siliconized vs nonsiliconized evaluated blood-collection tubes for free thyroxine measurements. *Clin. Chem.* **1982**, *28*, 2333–2334. [PubMed]
13. Kobayashi, M.; Kawase, T.; Horimizu, M.; Okuda, K.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals* **2012**, *40*, 323–329. [CrossRef] [PubMed]
14. Hermant, P.; Gane, P.; Huet, M.; Jallu, V.; Kaplan, C.; Sonneborn, H.H.; Cartron, J.P.; Bailly, P. Red cell ICAM-4 is a novel ligand for platelet-activated alpha IIb beta 3 integrin. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 4892–4898. [CrossRef] [PubMed]
15. Swanepoel, A.C.; Pretorius, E. Erythrocyte-platelet interaction in uncomplicated pregnancy. *Microsc. Microanal.* **2014**, *20*, 1848–1860. [CrossRef] [PubMed]
16. Kawase, T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: Basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology* **2015**, *103*, 126–135. [CrossRef] [PubMed]
17. Nakajima, Y.; Kawase, T.; Kobayashi, M.; Okuda, K.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. Bioactivity of freeze-dried platelet-rich plasma in an adsorbed form on a biodegradable polymer material. *Platelets* **2012**, *23*, 594–603. [CrossRef] [PubMed]
18. Okuda, K.; Kawase, T.; Momose, M.; Murata, M.; Saito, Y.; Suzuki, H.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J. Periodontol.* **2003**, *74*, 849–857. [CrossRef] [PubMed]
19. Anitua, E. Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants* **1999**, *14*, 529–535. [PubMed]
20. Kobayashi, M.; Kawase, T.; Okuda, K.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: A standardized comparison with PRP preparations. *Int. J. Implant Dent.* **2015**, *1*. [CrossRef] [PubMed]
21. Masuki, H.; Okudera, T.; Watanebe, T.; Suzuki, M.; Nishiyama, K.; Okudera, H.; Nakata, K.; Uematsu, K.; Su, C.Y.; Kawase, T. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int. J. Implant Dent.* **2016**, *2*. [CrossRef] [PubMed]
22. Kawase, T.; Tanaka, T.; Nishimoto, T.; Okuda, K.; Nagata, M.; Burns, D.M.; Yoshie, H. Improved adhesion of human cultured periosteal sheets to a porous poly(L-lactic acid) membrane scaffold without the aid of exogenous adhesion biomolecules. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *98*, 100–113. [CrossRef] [PubMed]
23. Horimizu, M.; Kawase, T.; Nakajima, Y.; Okuda, K.; Nagata, M.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. An improved freeze-dried PRP-coated biodegradable material suitable for connective tissue regenerative therapy. *Cryobiology* **2013**, *66*, 223–232. [CrossRef] [PubMed]



RESEARCH

Open Access



Platelet-rich fibrin prepared from stored whole-blood samples

Kazushige Isobe¹, Masashi Suzuki¹, Taisuke Watanabe¹, Yutaka Kitamura¹, Taiji Suzuki¹, Hideo Kawabata¹, Masayuki Nakamura¹, Toshimitsu Okudera¹, Hajime Okudera¹, Kohya Uematsu², Koh Nakata³, Takaaki Tanaka⁴ and Tomoyuki Kawase^{5*} 

Abstract

Background: In regenerative therapy, self-clotted platelet concentrates, such as platelet-rich fibrin (PRF), are generally prepared on-site and are immediately used for treatment. If blood samples or prepared clots can be preserved for several days, their clinical applicability will expand. Here, we prepared PRF from stored whole-blood samples and examined their characteristics.

Methods: Blood samples were collected from non-smoking, healthy male donors (aged 27–67 years, $N = 6$), and PRF clots were prepared immediately or after storage for 1–2 days. Fibrin fiber was examined by scanning electron microscopy. Bioactivity was evaluated by means of a bioassay system involving human periosteal cells, whereas PDGF-BB concentrations were determined by an enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: Addition of optimal amounts of a 10% CaCl_2 solution restored the coagulative ability of whole-blood samples that contained an anticoagulant (acid citrate dextrose) and were stored for up to 2 days at ambient temperature. In PRF clots prepared from the stored whole-blood samples, the thickness and cross-links of fibrin fibers were almost identical to those of freshly prepared PRF clots. PDGF-BB concentrations in the PRF extract were significantly lower in stored whole-blood samples than in fresh samples; however, both extracts had similar stimulatory effects on periosteal-cell proliferation.

Conclusions: Quality of PRF clots prepared from stored whole-blood samples is not reduced significantly and can be ensured for use in regenerative therapy. Therefore, the proposed method enables a more flexible treatment schedule and choice of a more suitable platelet concentrate immediately before treatment, not after blood collection.

Keywords: Platelet-rich fibrin, Coagulation, Fibrin fiber, Anticoagulant, Calcium chloride

Background

Blood preservation is generally and widely used in the fields of blood transfusion and surgery for either autologous or allogeneic blood [1–3]. In case of small lots of blood-derived materials used in regenerative therapy, such as platelet concentrates, it is generally accepted that autologous blood samples should be collected on-site and immediately centrifuged for processing [4]. Accordingly, it is officially recommended to use thus prepared materials immediately. The advantages of this

preparation protocol are the zero cost of preservation and no risk of degradation and contamination.

In Niigata University Hospital, when relatively severe surgical operations (e.g., large bone defects that require hospitalization for alveolar ridge augmentation and sinus floor elevation) are planned, relatively large volumes of blood samples are usually collected the day before the operation, and platelet-rich plasma (PRP) is prepared and stored at ambient temperature until use [5]. Nevertheless, there are no established methods for preparation of self-clotted platelet concentrates from stored whole-blood (WB) samples. This may be another reason why platelet-rich fibrin (PRF) should be prepared on-site and used immediately.

* Correspondence: kawase@dent.niigata-u.ac.jp

⁵Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

On the other hand, if PRF can be prepared from stored WB samples on the next day or later without significant reduction in the bioactivity, clinical applications of PRF will expand. In this study, we developed a method for preparation of PRF from stored WB samples by adding CaCl_2 and evaluated the quality in terms of suitability for regenerative therapy. As a result, we successfully validated the method and ensured the quality of PRF prepared from stored WB samples.

Methods

Blood collection, preservation, and PRF preparation

The study design and consent forms for all procedures performed on the study subjects were approved by the ethics committee for human subjects at Niigata University School of Medicine in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2008.

With informed consent, blood samples (~9.0 mL per tube) were collected from six non-smoking, healthy, male volunteers (27 to 67 years old) using 21-gauge needles equipped with conventional vacuum plain glass tube (Plain BD Vacutainer Tube; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) as described previously [6–8]. For preparation of control PRF by the conventional method, the anticoagulant was not added. Blood samples were immediately centrifuged or stored by gentle mixing using a tube rotator at ambient temperature (18–22 °C).

The blood samples collected with the anticoagulant and stored for up to 2 days were centrifuged by means of a Medifuge centrifugation system (Silfrudent S.r.l., Santa Sofia, Italy). After elimination of the red blood cell fractions, the resulting PRF clots, more specifically termed as concentrated growth factors (CGF) [9], were stored at –80 °C until measurement of growth factor concentration.

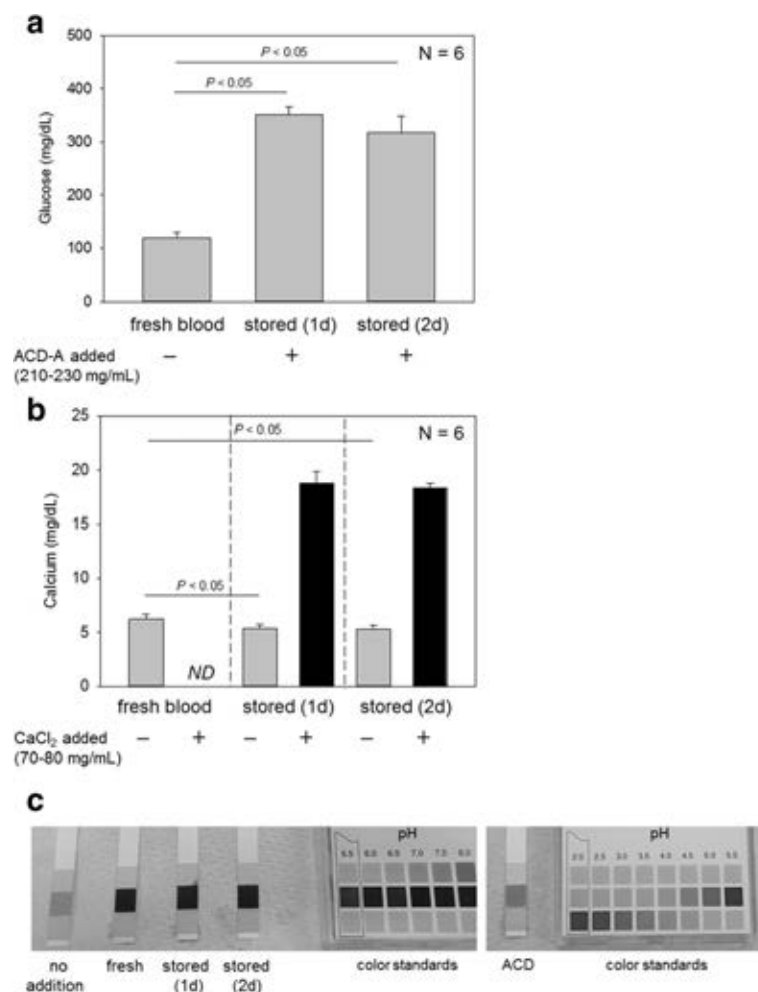


Fig. 1 Glucose levels (a), calcium levels (b), and pH (c) of stored WB samples. Supernatant serum fractions were examined. Plasma fractions prepared by quick centrifugation were used to determine calcium levels in fresh and stored WB samples that were not added CaCl_2 . $N = 6$

For preparation of platelet-poor plasma (PPP), blood samples (~9.0 mL) were collected from the same volunteers by means of plastic vacuum blood collection tubes (Neotube®; NIPRO, Osaka, Japan) equipped with 21-gauge needles, in the presence of 1.0 mL acid citrate dextrose solution-A formulation (ACD-A; Terumo, Tokyo, Japan), an anticoagulant [8, 10]. The blood samples were centrifuged on a KS-5000 centrifuge (Kubota, Tokyo, Japan) equipped with a swing rotor at 1700 rpm (530g) and 3000 rpm (1660g) for the first and second spin (8 min), respectively. The resulting supernatant fractions were collected as PPP preparations. To form fibrin clots, bovine thrombin (Liquid Thrombin MOCHIDA softbottle, Mochida Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) was added to PPP at a final volume percentage of 2.5%.

Determination of glucose, calcium, and pH

WB samples were quickly centrifuged at 1500 rpm for 3 min to prepare plasma fraction, which were subjected to determine total free calcium levels using a commercial kit based on MXB method (Calcium E-test WAKO; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan).

Stored WB samples were then mixed intermittently with 200 µL (20 µL × 10 times) of 10% CaCl₂ solution and centrifuged by a Medifuge centrifugation system to prepare PRF. When lower amounts of CaCl₂ were added, PRF clots were less reproducibly prepared. When higher amounts of CaCl₂ were added intermittently, or when the optimal amount of CaCl₂ were added at once, PRF clots were never prepared (Kawase, unpublished observations).

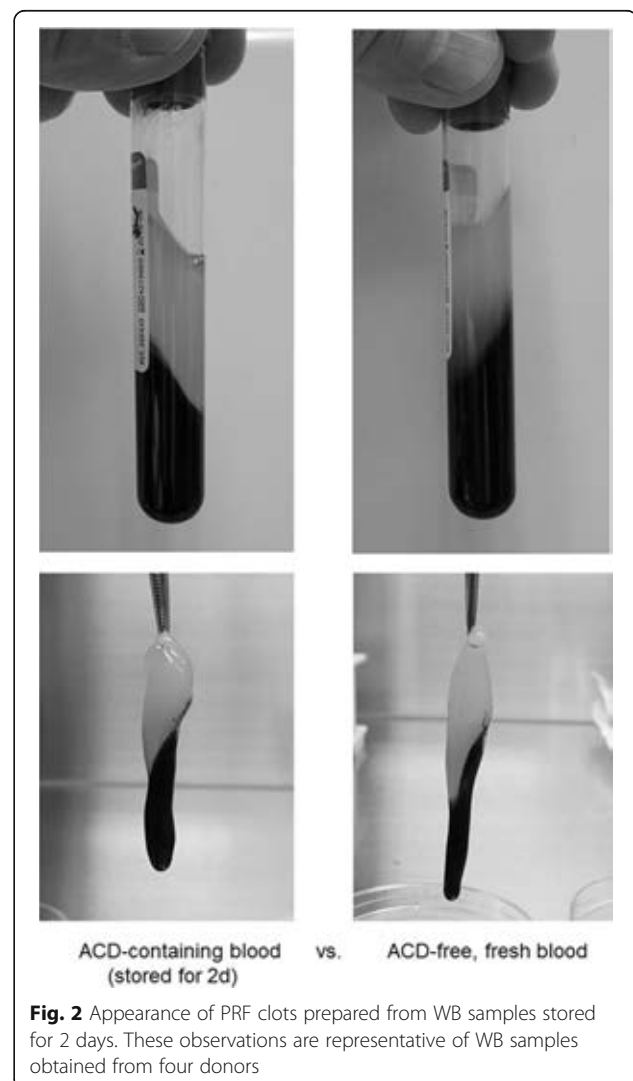
The supernatant serum fractions were subjected to determine calcium and glucose levels as described above and using a commercial kit based on GOD method (Glucose CII-test WAKO; Wako Pure Chemicals). The serum fractions were also used to determine pH levels by pH indicators (MColorHast; EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

A bioassay on human periosteal cells

The frozen PRF samples were minced with scissors and homogenized using a disposable homogenizer (Bio-Masher II, Nippi, Tokyo, Japan). After high-speed centrifugation (7340g), supernatants (PRF extracts) were collected and used for the bioassay described below and for measurement of growth factor levels.

Because alveolar periosteum strongly contributes to regeneration of periodontal skeletal tissue [11], we used human alveolar bone-derived periosteal cells for evaluation of the potency and efficacy of PRF preparations. The periosteal cells were obtained and expanded as described elsewhere [8, 12]. With informed consent,

human periosteum tissue segments were aseptically excised from the periodontal tissue on the healthy buccal side of the retromolar region of the mandibles of two non-smoking female volunteers (age = 19 and 29). Small periosteum pieces were expanded to form multilayered cellular periosteal sheets (Ø 30–40 mm), and then these sheets were enzymatically digested with 0.05% trypsin plus 0.52 mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) to release single cells. After expansion in monolayer cultures, the cells were seeded at a density of 0.4×10^4 per well in 24-well plates and treated with PRF extracts (0, 0.5, 1, 2, or 4%) for 72 h in DMEM containing 1% of fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Six different lots of PRF extracts were used for each experiment. At the end of the incubation periods, the cells were harvested using 0.05% trypsin plus 0.53 mM EDTA and immediately counted on an automated cell counter (Moxi-z; ORLFO Technologies, Ketchum, ID, USA) ($N = 6$) [13].



Quantification of a growth factor by an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

PRF extracts prepared as described above were subjected to measurement of PDGF-BB levels using the Human PDGF-BB Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) as described previously [8].

Scanning electron microscopy (SEM)

The PRF clots that were compressed in a stainless-steel compressor were fixed with 2.5% neutralized glutaraldehyde, dehydrated with a series of ethanol solutions and *t*-butanol, freeze-dried, and then examined under a scanning electron microscope (TM-1000, Hitachi, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 15 kV, as described elsewhere [7, 14].

Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). For multigroup comparisons, statistical analyses were conducted to compare the mean values by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple-comparison test (SigmaPlot 12.5; Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Differences with *P* values <0.05 were considered significant.

Results

Glucose and calcium contents and pH of WB or serum samples after centrifugation are shown in Fig. 1. Because

glucose is contained in the ACD-A solution, glucose levels in the stored WB and serum samples (see Fig. 4c) after centrifugation were significantly greater than those of freshly collected WB samples. Total free calcium levels, including calcium chelated by citrate, in WB samples decreased significantly during storage and were significantly increased by addition of a 10% CaCl_2 solution. The pH levels of freshly collected WB samples were 6.0–6.5, and similar pH was observed in stored WB samples. Addition of the ACD-A solution (~10%) did not significantly decrease the pH of the stored WB samples. For reference, pH of ACD-A solution was 4.5–5.0.

The appearance of PRF clots prepared from freshly collected WB samples and WB samples stored for 2 days are shown in Fig. 2. There were no visual differences between these two PRF preparations. Microstructure of fibrin clots formed from fresh and 2-day-old WB samples is shown in Fig. 3. As for thickness and cross-links of fibrin fibers, no substantial differences were observed. For reference, fibrin clots that were prepared from PPP and bovine thrombin were composed of apparently thinner fibrin fibers as compared with PRF clots from either fresh or stored WB samples.

The biological activity was tested on human periosteal cells. The effects of PRF extracts on the cell proliferation are shown in Fig. 4a. PRF extracts (0–4%) prepared from fresh, 1-day-old, and 2-day-old WB samples exerted similar stimulatory effects on the proliferation of

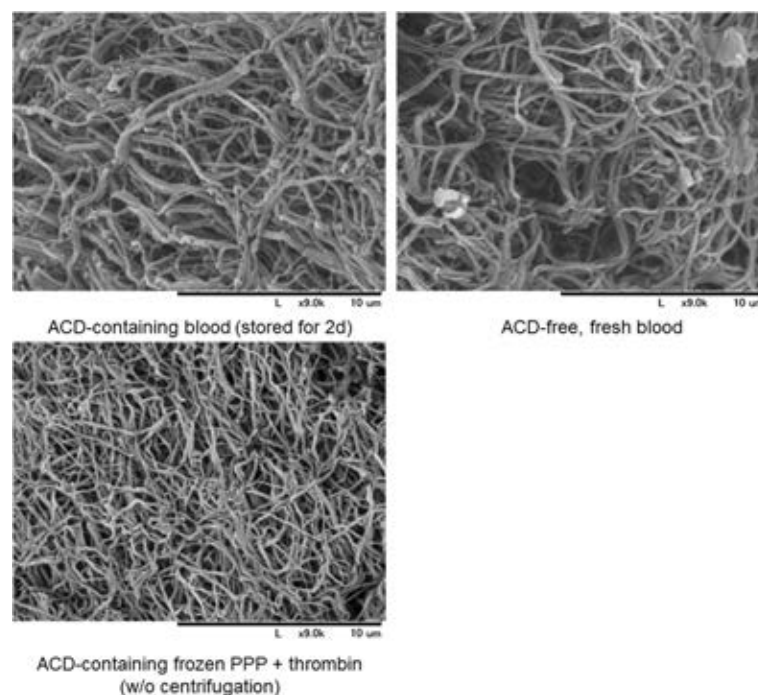


Fig. 3 SEM examination of fibrin fibers formed in self-clotted PRF and thrombin-stimulated PPP clots. PRF was prepared from fresh and 2-day-old WB samples. Similar observations were obtained from WB samples collected from three other donors. Scale bars = 10 μm

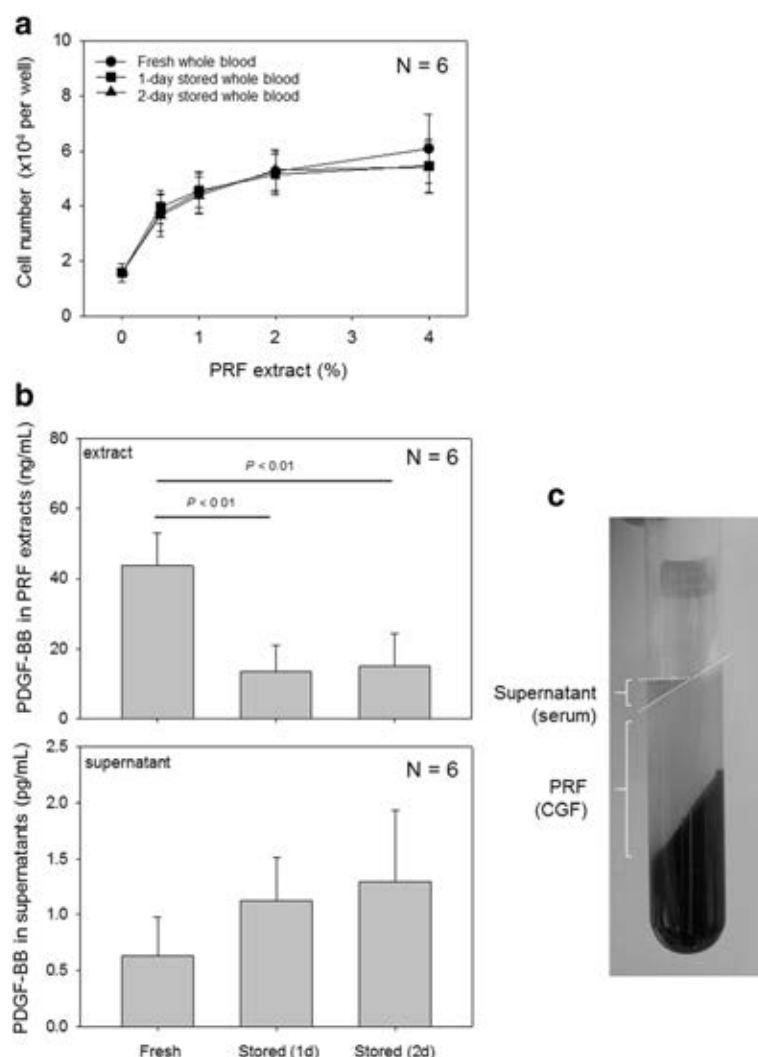


Fig. 4 Bioactivities and PDGF-BB concentrations in PRF extracts and the supernatant serum fraction. **a** PRF extracts were added to periosteal cell cultures and incubated for 3 days to evaluate their effects on cell proliferation. No significant differences were observed among three groups. **b** PRF extracts were subjected to measurement of PDGF-BB levels using an ELISA kit. No significant differences were observed in the supernatant among three groups. *N* = 6. **c** Representative localization of supernatant serum fraction of PRF preparation just after centrifugation

periosteal cells. PDGF-BB concentrations in PRF extracts prepared from fresh and stored WB samples are shown in Fig. 4b. PRF extracts and the supernatant serum fraction (see Fig. 4c) were subjected to measurement of PDGF-BB levels. The concentration of this representative growth factor of platelet concentrates [4] was significantly reduced in PRF extracts by storage. In contrast, PDGF-BB levels noticeably (but not significantly) increased in the supernatants.

Discussion

Platelet preservation is restricted to 3 and 5 days in Japan and worldwide, respectively. This limit is based on the fact that platelets are sensitive to changes in temperature and pH: when samples are stored at 2 to 6 °C, platelets become

unsuitable for production of platelet concentrates [3]. Preservation of platelet concentrates results in a drop of pH below 6.0 depending on the platelet count [15], and pH below 6.2 correlates with decreased *in vivo* efficacy of platelets [16]. Furthermore, it was recently demonstrated that growth factors in PRP degrade in the course of storage at 22 °C [17].

On the other hand, in general, WB can be stored in the presence of ACD or citrate phosphate and dextrose (CPD) at room temperature for a relatively long period (3 weeks or longer) before it is processed into blood components [1]. The WB storage has also been supported by recent developments in oxygen-permeable plastic bags. Nevertheless, out of concern about bacterial contamination, the maximal storage period is restricted

to 8 h in some countries [3]. To minimize and prevent bacterial proliferation, it is recommended to maintain white blood cells in WB samples during the initial 16 to 20 h of storage to digest bacteria during storage [18, 19].

Here, it is worth discussing which functional states of platelets are expected to be maintained during storage for subsequent preparation of platelet concentrates (to be used for regenerative therapy). There is no doubt that the functional states observed in freshly isolated platelets are the best for preparation of platelet concentrates and for their best clinical performance. Nevertheless, given that platelet concentrates are expected to provide significant amounts of growth factors and fibrin(ogen) at implantation sites, stored platelets are not necessarily expected to function as fully as fresh ones (e.g., in terms of aggregation). Rather, stored platelets are expected not to lose growth factors during the storage period, while coagulation factors, especially those involved in the endogenous coagulation cascade, should maintain their activities to convert and polymerize fibrinogen to form well cross-linked fibrin fibers.

Considering the current status of clinical use of platelet concentrates in the fields of periodontology and oral surgery, in this study, we used 10-mL glass tubes that are not oxygen-permeable instead of oxygen-permeable plastic bags for storage of large volumes of WB or platelets. We advanced a working hypothesis that the storage of WB samples in glass tubes would result in a more rapid and substantial pH drop and inactivation of several enzymes involved in coagulation. This study revealed that addition of an optimal amount of a CaCl_2 solution successfully restored the coagulation ability of the anticoagulant-supplemented WB samples. The fibrin fibers prepared from the stored WB samples were almost identical to those of fresh WB samples. PDGF-BB concentrations were significantly lower in PRF extracts prepared from stored WB samples than in those of fresh WB samples. This effect can be explained by a growth factor release from platelets after stimulation by calcium ions or maybe (less likely) by degradation of PDGF-BB. Nonetheless, the bioactivities did not significantly worsen during the short storage.

In general, autologous platelet concentrates are prepared and immediately used for regenerative therapy in dental clinics at present. Our method should expand the clinical applicability of platelet concentrates, especially PRF preparations, and make the treatment schedule more flexible.

Conclusions

The self-clotted types of platelet concentrates (PRF) can be prepared from ACD-containing stored WB by addition of CaCl_2 without a significant reduction in their bioactivity and without other specific reagents or devices. This approach should contribute to dissemination of PRF therapy.

Abbreviations

ACD: Acid citrate dextrose solution; CGF: Concentrated growth factors; CPD: Citrate phosphate and dextrose; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; PDGF: Platelet-derived growth factor; PPP: Platelet-poor plasma; PRF: Platelet-rich fibrin; PRP: Platelet-rich plasma; SEM: Scanning electron microscope; WB: Whole blood

Authors' contributions

KI, MS, TW, YK, and TK conceived and designed the study, performed the experiments, and wrote the manuscript. TS, HK, MN, TO, KU, and TT performed the experiments and data analysis. HO and KN participated in the manuscript preparation. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

Kazushige Isobe, Masashi Suzuki, Taisuke Watanabe, Yutaka Kitamura, Taiji Suzuki, Hideo Kawabata, Toshimitsu Okudera, Hajime Okudera, Kohya Uematsu, Koh Nakata, Takaaki Tanaka, and Tomoyuki Kawase declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

The study design and consent forms for all procedures performed on the study subjects were approved by the ethics committee for human subjects at Niigata University School of Medicine in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2008.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Tokyo Plastic Dental Society, Kita-ku, Tokyo, Japan. ²Division of Oral Implantology, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata, Japan. ³Bioscience Medical Research Center, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata, Japan. ⁴Department of Materials Science and Technology, Niigata University, Niigata, Japan. ⁵Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan.

Received: 21 December 2016 Accepted: 15 February 2017

Published online: 01 March 2017

References

- Hess J. Conventional blood banking and blood component storage regulation: opportunities for improvement. *Blood Transfus.* 2010;8 Suppl 3: s9–s15.
- World Health Organization. Manual on the management, maintenance and use of blood cold chain equipment. http://www.who.int/bloodsafety/Manual_on_Management,Maintenance_and_Use_of_Blood_Cold_Chain_Equipment.pdf. Accessed 26 Nov 2016.
- van der Meer PF, de Wildt-Eggen J. The effect of whole-blood storage time on the number of white cells and platelets in whole blood and in white cell-reduced red cells. *Transfusion.* 2006;46:589–94.
- Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology.* 2015;103:126–35.
- Nagata M, Hoshina H, Li M, Arasawa M, Uematsu K, Ogawa S, Yamada K, Kawase T, Suzuki K, Ogose A, Fuse I, Okuda K, Uoshima K, Nakata K, Yoshie H, Takagi R. A clinical study of alveolar bone tissue engineering with cultured autogenous periosteal cells: coordinated activation of bone formation and resorption. *Bone.* 2012;50:1123–9.
- Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *Int J Implant Dent.* 2015;1:31.
- Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals.* 2012;40:323–9.
- Masaki H, Okudera T, Watanabe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H, Nakata K, Uematsu K, Su CY, Kawase T. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth

- factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent*. 2016;2:19.
9. Corigliano M, Sacco L, Baldoni E. CGF-una proposta terapeutica per la medicina rigenerativa. *Odontoiatria*. 2010;1:69–81.
 10. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol*. 2003;74:858–64.
 11. Duan X, Bradbury SR, Olsen BR, Berendsen AD. *Matrix Biol*. 2016;52-54:127–40.
 12. Kawase T, Okuda K, Kogami H, Nakayama H, Nagata M, Nakata K, Yoshie H. Characterization of human cultured periosteal sheets expressing bone-forming potential: in vitro and in vivo animal studies. *J Tissue Eng Regen Med*. 2009;3:218–29.
 13. Kawase T, Hayama K, Tsuchimochi M, Nagata M, Okuda K, Yoshie H, Burns DM, Nakata K. Evaluating the safety of somatic periosteal cells by flow-cytometric analysis monitoring the history of DNA damage. *Biopreserv Biobank*. 2016;14:129–37.
 14. Horimizu M, Kawase T, Nakajima Y, Okuda K, Nagata M, Wolff LF, Yoshie H. An improved freeze-dried PRP-coated biodegradable material suitable for connective tissue regenerative therapy. *Cryobiology*. 2013;66:223–32.
 15. de Wildt-Eggen J, Schrijver JG, Bouter-Valk HJ, Fijnheer R, Bins M, van Prooijen HC. Improvement of platelet storage conditions by using new polyolefin containers. *Transfusion*. 1997;37:476–81.
 16. Murphy S, Rebutta P, Bertolini F, Holme S, Moroff G, Snyder E, Stromberg R. In vitro assessment of the quality of stored platelet concentrates. The BEST (Biomedical Excellence for Safer Transfusion) Task Force of the International Society of Blood Transfusion. *Transfus Med Rev*. 1994;8:29–36.
 17. Sonker A, Dubey A. Determining the effect of preparation and storage: an effort to streamline platelet components as a source of growth factors for clinical application. *Transfus Med Hemother*. 2015;42:174–80.
 18. Hogman CF, Gong J, Hambræus A, Johansson CS, Eriksson L. The role of white cells in the transmission of *Yersinia enterocolitica* in blood components. *Transfusion*. 1992;32:654–7.
 19. Pietersz RN, Reesink HW, Pauw W, Dekker WJ, Buisman L. Prevention of *Yersinia enterocolitica* growth in red-blood-cell concentrates. *Lancet*. 1992; 340:755–6.

Submit your manuscript to a SpringerOpen[®] journal and benefit from:

- Convenient online submission
- Rigorous peer review
- Immediate publication on acceptance
- Open access: articles freely available online
- High visibility within the field
- Retaining the copyright to your article

Submit your next manuscript at ► springeropen.com

RESEARCH

Open Access



Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF)

Kazushige Isobe¹, Taisuke Watanebe¹, Hideo Kawabata¹, Yutaka Kitamura¹, Toshimitsu Okudera¹, Hajime Okudera¹, Kohya Uematsu², Kazuhiro Okuda³, Koh Nakata⁴, Takaaki Tanaka⁵ and Tomoyuki Kawase^{6*} 

Abstract

Background: Fibrin clot membranes prepared from advanced platelet-rich fibrin (A-PRF) or concentrated growth factors (CGF), despite their relatively rapid biodegradability, have been used as bioactive barrier membranes for alveolar bone tissue regeneration. As the membranes degrade, it is thought that the growth factors are gradually released. However, the mechanical and degradable properties of these membranes have not well been characterized. The purpose of this study was to mechanically and chemically characterize these membranes.

Methods: A-PRF and CGF clots were prepared from blood samples collected from non-smoking, healthy donors and were compressed to form 1-mm-thick membranes. Platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF) clots were prepared by adding bovine thrombin to platelet-poor plasma. A tensile test was performed at the speed of 1 mm/min. Morphology of the fibrin fibers was examined by SEM. A digestion test was performed in PBS containing trypsin and EDTA.

Results: In the tensile test, statistical difference was not observed in Young's modulus, strain at break, or maximum stress between A-PRF and CGF. In strain at break, PPTF was significantly weaker than CGF. Likewise, fibrin fiber thickness and crosslink density of PPTF were less than those of other membranes, and PPTF degraded faster than others.

Conclusions: Although the centrifugal conditions are different, A-PRF and CGF are prepared by essentially identical mechanisms. Therefore, it is conceivable that both membranes have similar mechanical and chemical properties. Only PPTF, which was prepared by a different mechanism, was characterized as mechanically weaker and enzymatically more degradable.

Keywords: Platelet-rich fibrin, Concentrated growth factors, Platelet-poor plasma, Young's modulus, Fibrin fiber, Degradability

Background

Platelet-rich fibrin (PRF), a self-clotted preparation of platelet-concentrated, blood-derived biomaterials, is prepared solely by contact activation of intrinsic coagulation pathways through centrifugation without addition of coagulation factors [1, 2]. Therefore, the preparation protocol is drastically simplified, and the resulting clot can be handled easily with forceps. PRF is further modified to

two types: A-PRF, an advanced type that is expected to contain greater numbers of white blood cells [3] and concentrated growth factors (CGF), which is prepared under a facilitated intrinsic coagulation cascade [4]. Since these preparation protocols are similar and share the same principle of clot formation, A-PRF and CGF clots are not easy to differentiate either macroscopically or microscopically.

In clinical settings, both A-PRF and CGF preparations have been applied as barrier membranes and/or as carriers of growth factors to facilitate wound healing and tissue regeneration. However, their mechanical properties as

* Correspondence: kawase@dent.niigata-u.ac.jp

⁶Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

barrier membranes have not been investigated sufficiently. For example, there is no available evidence as to which membrane is mechanically tougher. In addition, because the fibrin membranes degrade gradually at the implantation site in vivo, it is poorly understood how their mechanical properties change during the degradation process.

Degradability is also closely related to growth factor release, a phenomenon that is a key parameter in the efficacy at the implantation site. Recently, it has been demonstrated that growth factors are concentrated in A-PRF/CGF clots and released with time [5–10]. These experimental systems simulated the initial phase of growth factor release by simple diffusion; however, the simulation experiments were performed using conventional culture media in the absence of serum or proteases, which is not an appropriate simulation system of in vivo conditions. Therefore, it is apparent that growth factor release by degradation of fibrin fibers [11] is not well simulated. In the data obtained from our previous [12] and preliminary studies, fibrin clots can be maintained without substantial degradation under similar protease-free conditions for longer than a week. However, clinicians have frequently claimed based on their clinical experiences that fibrin clots applied to surgical sites, e.g., socket after tooth extraction, are almost completely degraded within a week or two. This observation is supported by several clinical review articles [13, 14].

In this study, we hypothesized that the mechanical properties of the fibrin membrane are closely related to its degradability. We compared these characteristics among A-PRF, CGF, and PPTF membranes through tensile and digestion tests.

Methods

Preparation of A-PRF and CGF clots

Blood samples were collected from four non-smoking, healthy, male volunteers with ages ranging from 27 to 56 years. Although having lifestyle-related diseases and receiving medication, these donors had no hindrance in daily life. The study design and consent forms for all procedures performed with the study subjects were approved by the ethical committee for human subjects at Niigata University School of Medicine in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 as revised in 2008.

As described previously [6, 15, 16], blood samples (~9.0 mL) collected without anticoagulants using vacuum plain glass tubes (A-PRF+; Jiangxi Fenglin Medical Technology Co. Ltd., Fengcheng, China) or conventional vacuum plain glass tube (Plain BD Vacutainer Tube; Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) from the same donors were immediately centrifuged by an A-PRF centrifugation system (A-PRF12; DRAGON LABORATORY Instruments Ltd., Beijing, China) or a Medifuge centrifugation system (Silfradent

S. r. l., Santa Sofia, Italy). After eliminating the red blood cell (RBC) fractions, the resulting A-PRF and CGF clots were compressed using a stainless-steel compression device and preserved between wet gauze until mechanical testing (usually for a maximum of 3 h).

Preparation of PPP clots

To prepare platelet-poor plasma (PPP), peripheral blood (~9.0 mL) was collected using syringes containing A-formulation of acid-citrate-dextrose (ACD-A) (1.0 mL; Terumo, Tokyo, Japan) and immediately fractionated by the conventional double-spin method [17, 18]. The supernatant was collected as the PPP fraction. To prepare fibrin clots, bovine thrombin (Liquid Thrombin MOCHIDA Softbottle, Mochida Pharmaceutical Co. Ltd., Tokyo, Japan) was added to the PPP at a final volume percentage of 2.5% (v/v) at ambient temperature in glass chambers. The resulting PPP clots, which is designated as platelet-poor, thrombin-activated fibrin (PPTF), were compressed and preserved between wet gauze until mechanical testing (usually for a maximum of 3 h).

Determination of water content in fibrin clots

After excess amounts of exudate were quickly absorbed by the dry gauze, wet weights of freshly prepared A-PRF, CGF, and PPTF clots were measured using an electric balance. After compression with the stainless compressor, their weights were measured again. The compressed clots were then dried by heating at 140 °C for 30 min and were weighed in a pre-heated moisture analyzer (MA35; Sartorius Corporate Administration GmbH, Goettingen, Germany).

Mechanical testing

The mechanical properties of gel sheets were measured at a stretching speed of 1 mm/min with a desktop universal testing machine (EZ test; Shimadzu, Kyoto, Japan), of which maximum load cell capacity was 500 N under standard ambient conditions at 25 ± 3 °C and $50 \pm 25\%$ RH. The samples were gripped by clamps at each end (using slip-proof rubber sheets to prevent slippage) such that the initial apparent gauge length (the distance between clamp faces) was set to 10 mm for all the samples tested.

Young's modulus, maximum tensile strength, and tensile strain at break were obtained from the stress-strain plot. Stress was calculated by dividing the force by the initial tissue cross-sectional area, assuming a rectangular geometry (Table 1). The modulus for each sample was determined from the slope of the stress-strain curve during the apparent strain of 50–150% where the curve was almost linear while the sample had a sag during the apparent strain of 0–50%. The strain was recalculated to

eliminate the sag when the Young's modulus and the maximum strain at break.

According to the definition in the Handbook of Polymer Testing [19], "Young's modulus" is the modulus of elasticity in tension and defined as ratio of stress difference to the corresponding strain difference (stress/strain). In this study, the initial elongation property (slope) was evaluated to determine Young's modulus. "tensile strain at break" is defined as tensile strain at the tensile stress at break, if it breaks without yielding. "Maximum tensile stress" sustained by the test specimen during a tensile test represents tensile strength.

Digestion test

A-PRF/CGF/PPTF clots (1 mm thick) were compressed in the stainless-steel compressor [16] and were punched out ($\phi 8$ mm) using a biopsy punch (Kai Corp., Tokyo, Japan). After repeatedly rinsing the disks with PBS to eliminate as much serum as possible, the disks were immersed into 4 mL of 0.05% trypsin plus 0.53 mM EDTA (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in a 35-mm dish inside a CO₂ incubator. Fibrin is well known to be specifically degraded by plasmin *in vivo*; however, because it takes a long time to determine degradation using plasmin *in vitro* [12] and because fibrin could be degraded also by other proteases *in vivo*, we used trypsin plus EDTA, which is usually used in cell culture, in this study.

After pipetting the digestion solution, 50 μ L of the digestion solution was collected every 20 min and was stored at -20°C until protein measurement. Protein levels, which can be considered primarily as levels of digested fibrin fiber, were then determined by a BCA protein assay kit (Takara Bio, Kusatsu, Japan). The protein levels at the time point when the initial fibrin disks were completely digested overnight were evaluated at 100%.

Scanning electron microscopy (SEM)

The PRF clots that were compressed in a stainless-steel compressor, were fixed with 2.5% neutralized glutaraldehyde, dehydrated with a series of ethanol solutions and *t*-butanol, freeze-dried, and then were examined under a scanning electron microscope (TM-1000; Hitachi, Tokyo, Japan) with an accelerating voltage of 15 kV, as described previously [16].

Table 1 Similarity in size and stretching property of A-PRF and CGF membranes

	Size (W $\times$ L mm)	Stretching (times longer)	Number
A-PRF	$8.6 \pm 1.2 \times 27.5 \pm 3.5$	2–4	9
CGF	$8.4 \pm 0.8 \times 27.6 \pm 2.5$	2–4	9
PPTF	$8.3 \pm 1.2 \times 31.8 \pm 2.1$	2–4	3

Statistical analysis

The data were expressed as mean $\pm$ standard deviation (SD). For multi-group comparisons, statistical analyses were conducted to compare the mean values by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunn's multiple-comparison test (SigmaPlot 12.5; Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA). Differences with *P* values < 0.05 were considered significant.

Results

The main purpose of this study was to compare A-PRF with CGF preparations to find possible differences in mechanical properties. As shown in Table 1, the sizes of A-PRF clots compressed to membranes were 8.6 ± 1.2 mm (W) $\times$ 27.5 ± 3.5 mm (L) and very similar to those of CGF clots (8.4 ± 0.8 mm $\times$ 27.6 ± 2.5 mm). As reference, PPTF membranes were also prepared by adding CaCl₂ to liquid PPP preparations using a molding glass chamber. The size of PPP membranes prepared by adding thrombin, designated PPTF in this study, was 8.3 ± 1.2 mm $\times$ 31.8 ± 2.1 mm. Furthermore, when subjected to the tensile test, both membranes could be stretched two to four times their original length. As shown in Table 2, the water content of A-PRF clots was very similar to that of CGF clots. However, PPTF clots contained significantly less amounts of water than both A-PRF and CGF clots.

Surface microstructures of various fibrin clots, including A-PRF and CGF clots, were compared, as shown in Fig. 1. Based on SEM examinations, CGF clots contained thicker fibrin fibers than A-PRF clots. PPP clots prepared by adding CaCl₂ were composed mainly of relatively thin fibers. In contrast, PPTF clots were easily distinguishable from the other three clot types and were composed of highly crosslinked fibers that were the thinnest observed.

Individual membrane types were examined by a tensile test and were characterized by three parameters: (1) Young's modulus, (2) strain at break, and (3) maximum stress in the stress-strain curves. As shown in Fig. 2, no significant differences in both Young's modulus and maximum stress were observed among A-PRF, CGF, and PPTF membranes. However, in strain at break, PPTF membranes were significantly inferior to CGF membranes.

Degradability of individual membrane types was examined in PBS containing trypsin and EDTA. As shown in

Table 2 Comparison of water content of A-PRF, CGF, and PPTF clots

	Wet weight (g)	Dry weight (g)	Water content (%)
A-PRF	1.905 ± 0.416	$0.043 \pm 0.014^*$	$97.8 \pm 0.7^*$
CGF	1.753 ± 0.302	$0.035 \pm 0.009^*$	$98.0 \pm 0.6^*$
PPTF	1.774 ± 0.287	0.066 ± 0.004	96.2 ± 0.7

N = 5

**P* < 0.05 compared with PPTF

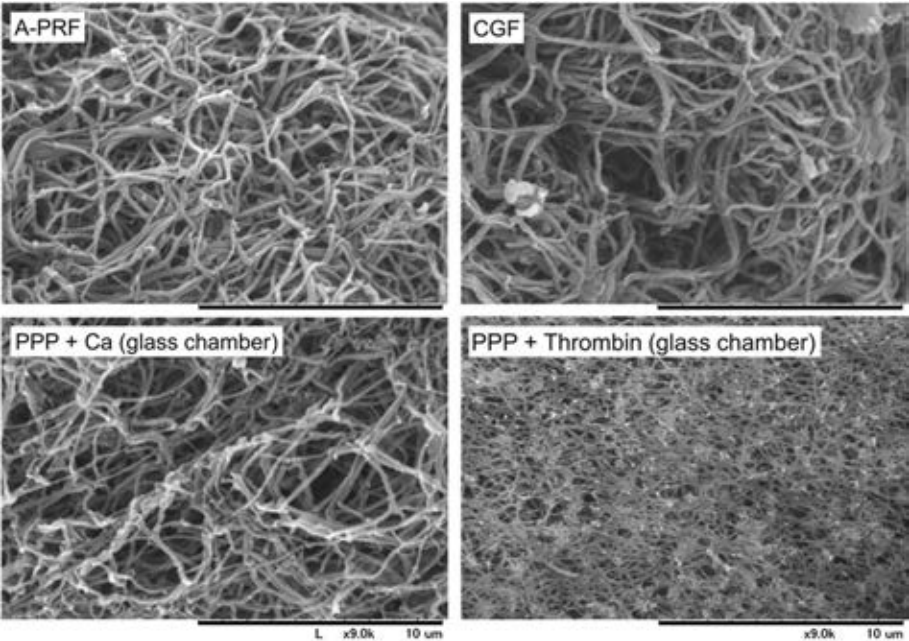


Fig. 1 Surface microstructures of A-PRF, CGF, and fibrin clots prepared by PPP + CaCl₂ and PPTF (fibrin clots prepared by PPP and thrombin). Similar observations were obtained from other three independent blood samples. Scale bar = 10 μm. Note: the same magnification (x9000) was used in all the SEM images shown here

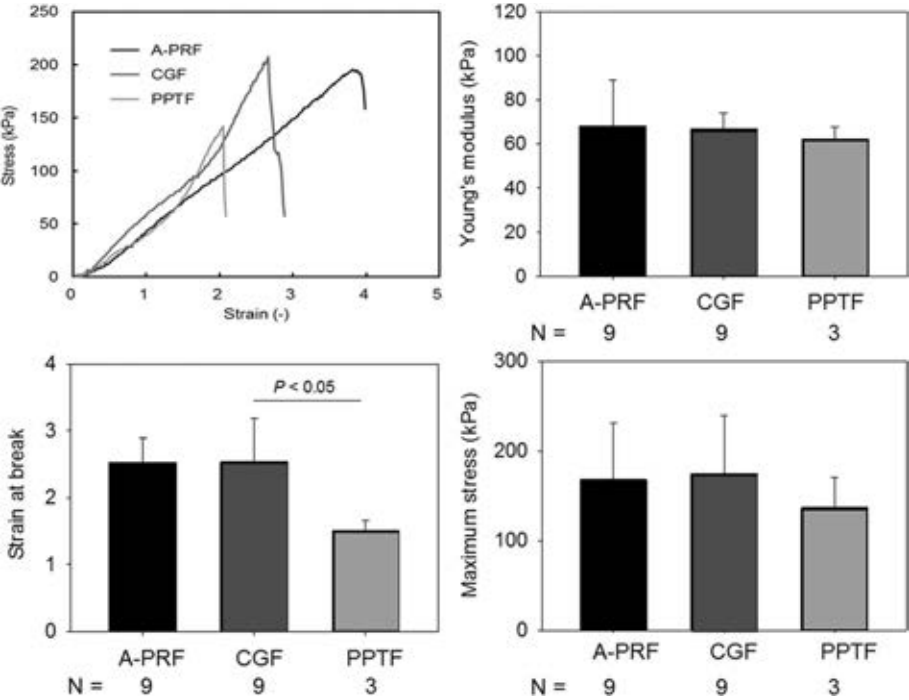


Fig. 2 Representative stress-strain curves for A-PRF and CGF membranes and mechanical properties (Young's modulus, strain at break, and maximum stress) of A-PRF, CGF, and PPTF membranes. N = 3–9

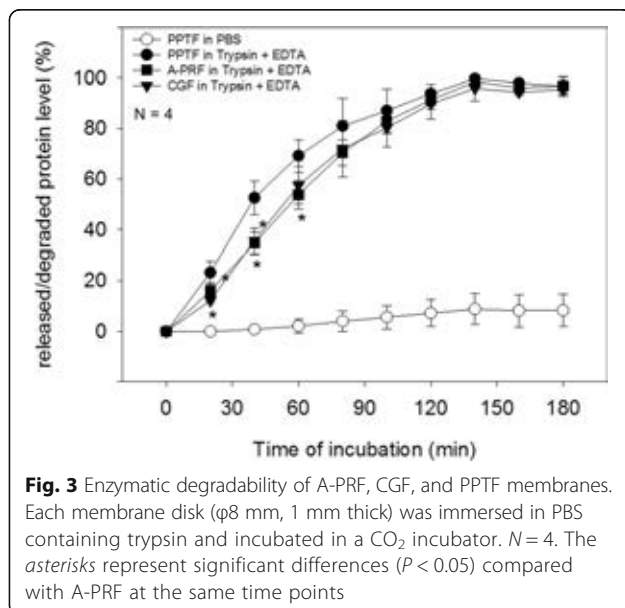


Fig. 3, PPTF membranes degraded significantly faster than A-PRF and CGF membranes. This disparity in degradability was observed at 20 and 40 min.

Discussion

In this study, we found no apparent differences between A-PRF and CGF clot microstructures, especially in fibrin fiber thickness or crosslink density. However, in PPTF clots, which were prepared through direct conversion of fibrinogen by thrombin, fibrin fiber thickness and their crosslink density were substantially thinner and higher, respectively, than those of either A-PTF or CGF clots. This finding was supported by the water content data, which revealed that significantly less amounts of water were contained in PPTF clots. These data are summarized along with the centrifugal conditions in Table 3.

Since the ratio of surface area to volume is known to be a significant factor for degradation of polymer material

[20], these structural characteristics can be correlated to their degradability. As expected, we demonstrated that PPTF membranes degraded faster than other self-clotted fibrin membranes and A-PRF and CGF degradation rates were almost identical. However, it has not yet been clarified if those structural characteristics are correlated to mechanical properties.

In the tensile test, we again found no significant difference in any parameters evaluated among A-PRF, CGF, and PPTF membranes. However, in the strain at break, PPTF membranes were broken by a significantly weaker tensile force. The order of this parameter from high to low was CGF $\approx$ A-PRF > PPTF. As described above, the order of degradability was PPTF > CGF $\approx$ A-PRF, which is the reverse of the mechanical strength. Despite higher crosslink density, fibrin fibers formed in PPTF clots were substantially thinner and therefore they are probably not capable of bearing higher tensile forces. The manufacturer explains that the difference between PRF and CGF is related to the centrifugation techniques; programmed switching between acceleration and deceleration facilitates both conversion of fibrinogen to fibrin and their polymerization more efficiently than centrifugation at fixed speeds. However, as far as we examined, CGF is identical to A-PRF in terms of mechanical and degradable properties.

Growth factor release is a key function of these fibrin clots for tissue regeneration. Our previous study [16] demonstrated that CGF membranes compressed by the stainless steel compression device contain significantly higher levels of growth factors even after releasing approximately 85% of exudate. Repeated rinsing with PBS failed to completely remove the growth factors from CGF membranes. The rinsed CGF membranes retained angiogenic effects in ex vivo and in vitro experimental systems. Considered together, these data imply that significant amounts of the growth factors are secured in CGF membranes, specifically in fibrin fibers. Similar

Table 3 Summaries of preparation procedures, relative mechanical, degradation, and related properties of A-PRF, CGF and PPTF

	A-PRF	CGF	PPTF
Centrifugal conditions	198 g $\times$ 8 min	692 g $\times$ 2 min ^a 547 g $\times$ 4 min 692 g $\times$ 4 min 855 g $\times$ 3 min	580 g $\times$ 8 min (1st) ^b 1060 g $\times$ 8 min (2nd)
Anticoagulants	None	None	ACD-A
Coagulation factors	None	None	Thrombin
Mechanical strength	Tough	Tough	Moderate
Serum retention	High	High	Medium
Degradation	Moderate	Moderate	Fast
Fibrin fibers	Thickness	Thick	Thin
	Crosslink density	Low	High

^aThe centrifugal force was automatically changed by the specific program of centrifuge

^bPPP was prepared by the double-spin method

functions were found in A-PRF and PPTF membranes. Therefore, it is thought that two distinct mechanisms are involved in controlled release of growth factors in exudate-depleted fibrin membranes: growth factors adsorbed to fibrin fibers and growth factors caged in platelets aggregated on fibrin fibers.

The initial phase of growth factor release from fibrin clots is mainly attributed to simple diffusion. In contrast, the late phase, i.e., the delayed growth factor release, is probably due to degradation of fibrin fibers and platelet membranes. We think that these combined releasing mechanisms determine how long the individual fibrin clot types last for tissue regeneration. This complex process of growth factor release from PRF (CGF) membranes should be investigated more carefully by developing appropriate experimental conditions.

Conclusions

In the mechanical parameters and degradability we tested, CGF membranes were almost identical to A-PRF membranes. In contrast, PPTF membranes were mechanically weaker and highly degradable. Therefore, we conclude that all of these fibrin membranes are tough enough to serve as barrier membranes; however, we should pay attention to their degradability and choose an appropriate membrane type depending on the purpose of treatment and the condition of wounds or bone defects.

Abbreviations

ACD: Acid citrate dextrose solution; A-PRF: Advanced platelet-rich fibrin; CGF: Concentrated growth factors; PPTF: Platelet-poor plasma-derived, thrombin-activated fibrin; PRP: Platelet-rich plasma

Authors' contributions

KI, TW, TT, and TK conceived and designed the study, performed the experiments, and wrote the manuscript. HK, YK, TO, KU, and KO performed the experiments and data analysis. YK, HO, and KN participated in manuscript preparation. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Competing interests

Kazushige Isobe, Taisuke Watanebe, Hideo Kawabata, Yutaka Kitamura, Toshimitsu Okudera, Hajime Okudera, Kohya Uematsu, Kazuhiro Okuda, Koh Nakata, Takaaki Tanaka, and Tomoyuki Kawase state that they have no competing interest.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Tokyo Plastic Dental Society, Kita-ku, Tokyo, Japan. ²Division of Dental Implantology, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata, Japan. ³Division of Periodontology, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan. ⁴Bioscience Medical Research Center, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata, Japan. ⁵Department of Materials Science and Technology, Niigata University, Niigata, Japan. ⁶Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata, Japan.

Received: 29 January 2017 Accepted: 25 April 2017

Published online: 02 May 2017

References

- Choukroun J, Diss A, Simonpieri A, Girard MO, Schoeffler C, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Dohan DM. Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part V: histologic evaluations of PRF effects on bone allograft maturation in sinus lift. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101:299–303.
- Kawase T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology.* 2015;103:126–35.
- Choukroun J. Advanced PRF, & i-PRF: platelet concentrates or blood concentrates? *J Periodont Med Clin Practice.* 2014;1:3.
- Corigliano M, Sacco L, Baldoni E. CGF- una proposta terapeutica per la medicina rigenerativa. *Odontoiatria.* 2010;1:69–81.
- Ghanaati S, Booms P, Orlowska A, Kubesch A, Lorenz J, Rutkowski J, Landes C, Sader R, Kirkpatrick C, Choukroun J. Advanced Platelet-Rich Fibrin (A-PRF)– a new concept for cell-based tissue engineering by means of inflammatory cells. *J Oral Implantol.* 2014: in press.
- Masaki H, Okudera T, Watanebe T, Suzuki M, Nishiyama K, Okudera H, Nakata K, Uematsu K, Su CY, Kawase T. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in platelet-rich plasma (PRP), plasma rich in growth factors (PRGF), advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), and concentrated growth factors (CGF). *Int J Implant Dent.* 2016;2:19.
- Fujioka-Kobayashi M, Miron RJ, Hernandez M, Kandalam U, Zhang Y, Choukroun J. Optimized Platelet Rich Fibrin With the Low Speed Concept: Growth Factor Release, Biocompatibility and Cellular Response. *J Periodontol.* 2016;88:112–21.
- Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ. Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig.* 2016;20:2353–60.
- Passaretti F, Tia M, D'Esposito V, De Pascale M, Del Corso M, Sepulveres R, Liguoro D, Valentino R, Beguinot F, Formisano P, Sammartino G. Growth-promoting action and growth factor release by different platelet derivatives. *Platelets.* 2014;25:252–6.
- Schar MO, Diaz-Romero J, Kohl S, Zumstein MA, Nesic D. Platelet-rich concentrates differentially release growth factors and induce cell migration in vitro. *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473:1635–43.
- Mosesson MW. Fibrinogen and fibrin structure and functions. *J Thromb Haemost.* 2005;3:1894–904.
- Kawase T, Kamiya M, Kobayashi M, Tanaka T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. The heat-compression technique for the conversion of platelet-rich fibrin preparation to a barrier membrane with a reduced rate of biodegradation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2015;103:825–31.
- Hartshorne J, Gluckman H. A comprehensive clinical review of Platelet Rich Fibrin (PRF) and its role in promoting tissue healing and regeneration in dentistry. Part II: preparation, optimization, handling and application, benefits and limitations of PRF. *Int Dent.* 2016;6:34–48.
- Wang J, Wang L, Zhou Z, Lai H, Xu P, Liao L, Wei J. Biodegradable polymer membranes applied in guided bone/tissue regeneration: a review. *Polymers (Basel).* 2016;8:115.
- Kobayashi M, Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *Int J Implant Dent.* 2015;1:31.
- Kobayashi M, Kawase T, Horimizu M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals.* 2012;40:323–9.
- Nakajima Y, Kawase T, Kobayashi M, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H. Bioactivity of freeze-dried platelet-rich plasma in an adsorbed form on a biodegradable polymer material. *Platelets.* 2012;23:594–603.
- Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H. Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol.* 2003;74:849–57.
- Hawley S. Particular requirements for plastics. In: Brown R, editor. *Handbook of polymer testing.* New York: Marcel Dekker, Inc; 1999. p. 313.
- Makadia HK, Siegel SJ. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers (Basel).* 2011;3:1377–97.



Article

Quality Assessment of Platelet-Rich Fibrin-Like Matrix Prepared from Whole Blood Samples after Extended Storage

Hideo Kawabata ¹, Kazushige Isobe ¹, Taisuke Watanabe ¹, Toshimitsu Okudera ¹, Masayuki Nakamura ¹, Masashi Suzuki ¹, Jietsu Ryu ¹, Yutaka Kitamura ¹, Hajime Okudera ¹, Kazuhiro Okuda ², Koh Nakata ³ and Tomoyuki Kawase ^{4,*} 

¹ Tokyo Plastic Dental Society, Kita-ku, Tokyo 1140002, Japan; hidei@eos.ocn.ne.jp (H.K.); kaz-iso@tc4.so-net.ne.jp (K.I.); watatai@mui.biglobe.ne.jp (T.W.); toshiokuderaphd@gmail.com (T.O.); maoh4618@me.com (M.N.); g-yanagidouri-dental@crux.ocn.ne.jp (M.S.); ryu@cap.ocn.ne.jp (J.R.); shinshu-osic@mbn.nifty.com (Y.K.); okudera@carrot.ocn.ne.jp (H.O.)

² Division of Periodontology, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata 9518514, Japan; okuda@dent.niigata-u.ac.jp

³ Bioscience Medical Research Center, Niigata University Medical and Dental Hospital, Niigata 9518520, Japan; radical@med.niigata-u.ac.jp

⁴ Division of Oral Bioengineering, Institute of Medicine and Dentistry, Niigata University, Niigata 9518514, Japan

* Correspondence: kawase@dent.niigata-u.ac.jp; Tel.: +81-252-627-559

Received: 20 August 2017; Accepted: 14 September 2017; Published: 18 September 2017

Abstract: The platelet-rich fibrin-like matrix (PRFM) is usually prepared onsite and immediately used for regenerative therapy. Nonetheless, to meet the clinical necessity of preserving the PRFM without quality deterioration, we developed a method for preparation of PRFMs from short-term-stored whole blood (WB) samples. In this study, to evaluate the practical expiration date of storage, we extended the storage time of WB samples from 2 to 7 days and assessed the quality of the resulting PRFMs. WB samples collected with acid-citrate-dextrose were stored with gentle agitation at ambient temperature. To prepare PRFMs, the stored WB samples were mixed with CaCl₂ in glass tubes and centrifuged. Fibrin fiber networks, CD41 and CD62P expression, and Platelet Derived Growth Factor-BB (PDGF-BB) levels were examined by scanning electron microscopy (SEM), flow cytometry, and an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA), respectively. Long-term storage had no significant effect on either blood cell counts or platelet functions tested. The resulting PRFMs were visually identical to freshly prepared ones. PDGF-BB levels did not markedly decrease in a time-dependent manner. However, fibrin fibers gradually became thinner after storage. Although the coagulation activity may diminish, we propose that PRFMs can be prepared—without evident loss of quality—from WB samples stored for up to 7 days by our previously developed method.

Keywords: platelets; platelet-rich fibrin; platelet-derived growth factor; fibrin fiber; storage

1. Introduction

Among the various types of platelet concentrates, the platelet-rich fibrin-like matrix (PRFM) has been increasingly used as the most convenient biomaterial for regenerative therapy in dentistry [1]. Moreover, this popularity is supported by its multiple functions as both a matrix and scaffold and its higher capacity for tissue regeneration than platelet-rich plasma (PRP) [2,3]. When compared with other platelet concentrate subtypes, PRFM is usually expected to be prepared onsite as per patients' needs, and immediately used for regenerative therapy. In practice, however, due to a patient's physical

condition or a doctor's technical capabilities, PRP is extensively prepared on the day or just before a surgical procedure.

In Japan, new regulations for regenerative medicine established in 2014 require all physicians and dentists administering a regenerative therapy that involves a platelet concentrate to record and report the preparation procedures and quality assessment data for PRFM preparations [4]. As a time-saving measure, some physicians or dentists, mainly in private practice, outsource the PRFM preparation process. Therefore, there is a need to develop an off-site PRFM preparation process.

Because anticoagulants, such as citrate and acid-citrate-dextrose (ACD), are added to whole blood (WB) during collection, PRP can be prepared from stored blood and delivered the next day. Even though some physicians or dentists intend to outsource PRFM preparation, due to a lack of anticoagulants, PRFMs cannot be prepared off-site on the next day. Accordingly, another option is to preserve their home-made PRFMs under appropriate conditions. However, there is no reliable scientific evidence to support the safety and effectiveness of a preserved PRFM.

To circumvent this problem, in our previous study [5], we developed a technique for preparation of PRFMs from WB samples stored short-term, and we validated their quality for use as a biomaterial for regenerative therapy. In this previous study, however, we examined WB samples stored only for up to 2 days. It is still unclear how long WB samples can be stored for PRFM preparation without significant quality loss. In blood transfusion, platelet products can be stored for a maximum of 4–7 days, depending on national guidelines and the type of product [6]. Therefore, it can be predicted that platelets may not be useful for medical purposes after this expiry period. In this study, to evaluate biological implications of the officially recommended period of storage for our purposes, we applied our previously developed technique to WB samples stored for relatively long periods (≥ 5 days) and assessed the quality of the resulting PRFMs.

To help readers correctly understand the identity of the fibrin matrix preparations used in this study, we should emphasize the differences between our PRFM and Choukroun's PRF: although in a broad sense and judging by visual inspection, our PRFM is almost identical to Choukroun's original PRF prepared from freshly collected WB samples without anticoagulants, our PRFM may be distinguished from original PRF by the use of both an anticoagulant and CaCl_2 and the protocol for concentrated growth factors (CGF) preparation in a narrow sense.

2. Experimental Section

2.1. Blood Collection, Preservation, and Platelet-Rich Fibrin-Like Matrix (PRFM) Preparation

The study design and consent forms for all procedures involving human participants were approved by the ethics committee for human subjects at Niigata University School of Medicine in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (revised in October 2008).

Blood samples (approximately 9.0 mL per tube) were collected from six nonsmoking healthy male volunteers (age 32–68 years) using 21-gauge needles equipped with a conventional vacuum plain glass tube (Plain BD Vacutainer Tube; Becton, Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, USA) for immediate PRFM preparation or with a vacuum plain plastic tube (Neotube; NIPRO, Osaka, Japan) for stored WB samples as previously described [7–9].

For preparing a control PRFM by the conventional method, fresh WB samples were collected into glass tubes in the absence of ACD-A (Terumo, Tokyo, Japan) and were immediately centrifuged by means of a Medifuge centrifugation system (Silfradent S.R.L., Santa Sofia, Italy). This centrifuge was designed to prepare CGF (which may be considered a member of the PRF family) and employs a program that automatically changes the centrifugal speed as follows: 30", acceleration; 2', 2700 rpm ($600 \times g$); 4', 2400 rpm ($500 \times g$); 3', 3000 rpm ($800 \times g$); and 36", deceleration and stop [10].

For delayed preparation of PRFM, WB samples were collected into plastic tubes in the presence of ACD-A and stored for up to 7 days at ambient temperatures (20–24 °C) with gentle agitation using a tube rotary mixer (NRC-20R; Nissin, Tokyo, Japan). At various time points, the stored WB samples were

transferred into glass tubes, warmed at 37 °C, intermittently mixed with 200 µL (20 µL × 10 times) of a 10% CaCl₂ solution and centrifuged on the Medifuge centrifugation system. After elimination of the red blood cell (RBC) fractions by forceps, the resulting PRFM samples were immediately compressed with a stainless-steel PRFM compression device (PRF stamper[®]; JMR Corp. Ltd., Niigata, Japan) [11] and washed thrice with PBS for scanning electron microscopy (SEM) or stored without washing at −80 °C until determination of PDGF-BB levels.

2.2. Measurement of Glucose and Ca²⁺ Levels and pH

Prior to Ca²⁺ addition, the stored WB samples were quickly centrifuged at 415× g for 3 min to obtain the plasma fraction, which was used to determine total free Ca²⁺ levels by means of a commercial kit based on the MXB method (Calcium E-test Wako; Wako Pure Chemicals, Osaka, Japan) as described elsewhere [5].

For PRFM preparation, the supernatant serum fractions obtained after centrifugation were subjected to analysis of Ca²⁺ levels as described above and to quantification of glucose with a commercial kit based on the GOD method (Glucose CII Test Wako; Wako Pure Chemicals) [5]. The serum fractions were also subjected to measurement of pH with pH indicators (MColorHast; EMD Millipore Corp., Billerica, MA, USA) [5].

2.3. Quantification of a Growth Factor by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

PDGF-BB levels were measured in the PRFM extracts using the Human PDGF-BB Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) as previously described [8,11,12]. In brief, individual PRFM samples were minced and homogenized for 1 min with sample tube size disposable homogenizers (BioMasher II; Nippi, Tokyo, Japan). After centrifugation, the resulting supernatants were analyzed by an ELISA.

2.4. Determination of Blood Cell Counts

The total number of blood cells in WB samples and in fractionated liquid samples was determined in the same types of sample tubes and an automated hematology analyzer (pocH-100iV Diff; Sysmex, Kobe, Japan) [5,13]. RBCs, white blood cells (WBCs), and platelets were counted either immediately after blood collection or after storage, but before centrifugation.

2.5. Flow-Cytometric (FCM) Analyses

The platelet fraction was isolated from WB samples by centrifugation (530× g, 10 min), washed twice with PBS, and resuspended in PBS at a density of 1–2 × 10⁸/mL. The platelets were incubated with 10 mM adenosine 5'-diphosphate (ADP; Wako Pure Chemical, Osaka, Japan) or 0.1% CaCl₂ (Wako) for 15 min at ambient temperature. To stop the reaction, an equal volume of a commercial fixative, ThromboFix (Beckman-Coulter, Brea, CA, USA) was added to each platelet suspension (100 µL) and incubated for 30 min. Platelets were then washed twice with PBS and probed with both a phycoerythrin (PE)-conjugated mouse monoclonal anti-CD41 antibody and a fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse monoclonal CD62P antibody (1:20) (BioLegend, San Diego, CA, USA) for 45 min at ambient temperature. After two washes with PBS, platelets were analyzed on a flow cytometer (Cell Lab Quanta SC; Beckman-Coulter Inc., Brea, CA, USA) as previously described [14]. For isotype controls, mouse IgG1 (BioLegend) was employed.

2.6. Scanning Electron Microscopy

To examine the microstructure of fibrin fiber networks, PRFM samples were compressed, washed thrice with PBS, and cut into small pieces. Then, the PRFM pieces were fixed with 2.5% glutaraldehyde, dehydrated with a series of ethanol and t-butanol washes, freeze-dried, and finally examined by SEM (TM-1000, Hitachi, Tokyo, Japan) with accelerating voltage 15 kV, as previously described [5,15].

2.7. Evaluation of Platelet Surface Antigen Expression by an Immunofluorescence Assay

Platelet concentrates were prepared from stored WB samples, rinsed, and resuspended in PBS in sample tubes. Platelets were then treated with CaCl_2 at a final concentration of 0.1% and incubated for 15 min at ambient temperature. ADP (10 mM) served as a positive control [16]. After completion of the required incubation time, the reaction was stopped by addition of ThromboFix (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA). The platelets were washed twice and incubated with anti-human CD41 or CD62P monoclonal antibodies (1:20; BioLegend, San Diego, CA, USA) (primary antibodies) for 40 min at ambient temperature. Next, the platelets were again washed twice with PBS and were probed with a secondary antibody, a goat anti-mouse IgG H&L antibody (an Alexa Fluor® 555 conjugate; 1:50; Abcam, Cambridge, MA, USA), for 30 min at ambient temperature. Finally, after subsequent PBS washes, the platelets were mounted with an antifade mounting medium (Vectashield®; Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA), and CD41 and CD62P expression levels were examined under a fluorescence microscope equipped with a cooled CCD camera (Nikon, Tokyo, Japan).

2.8. Statistical Analysis

The results are reported as mean $\pm$ standard deviation (SD). For multigroup comparisons, statistical analyses were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) (SigmaPlot 12.5; Systat Software, Inc., San Jose, CA, USA) with Bonferroni's post hoc test. Differences with p -values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Time-Dependent Changes in The Characteristics of Whole Blood Samples

WB samples were stored with gentle agitation at ambient temperature because they were collected into plain plastic tubes and stored for up to 7 days. During this period, both the platelet and RBC counts did not change significantly (Figure 1a,b). Additionally, WBC counts did not shift, but relative percentages of WBC subtypes underwent marked alterations (Figure 1c,d). The percentages of small and medium-size components of WBCs, such as lymphocytes, increased, whereas those of the large components, such as granulocytes, decreased.

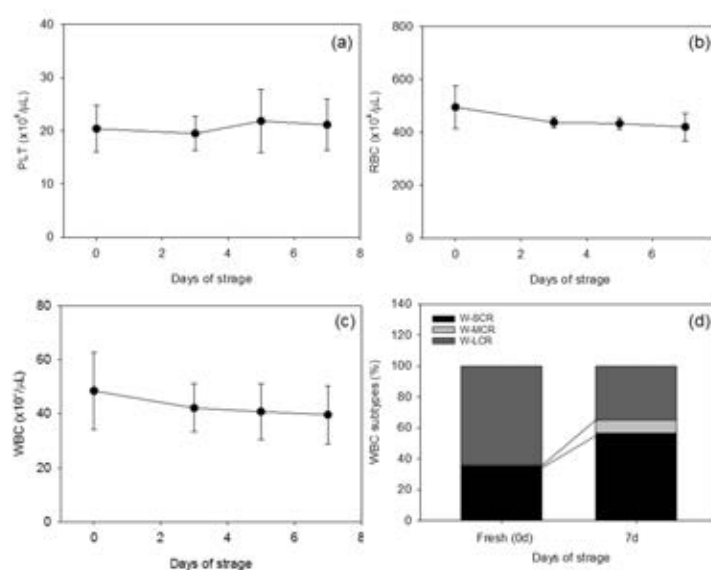


Figure 1. (a–c) Stable counts of platelets, red blood cells (RBCs), and white blood cells (WBCs) in stored whole blood samples ($n = 8$); (d) A comparison of WBC components between fresh and 7-day-stored WB samples. The data were calculated from an average of 8 samples. W-SCR: WBC small cell ratio, W-MCR: WBC middle cell ratio, W-LCR: WBC large cell ratio.

Platelets' responses to stimulants were evaluated by comparing the expression of CD62P with that of CD41 [17]. After storage for 2 days, CD41 expression was similar among all the samples, regardless of the external stimuli (0.1% CaCl_2 or 10 mM ADP for 15 min; Figure 2). In contrast, CD62P expression levels were upregulated by the CaCl_2 or ADP challenge. The 7-day storage duration did not alter the platelet activation responses. CD62P expression levels were likewise increased by treatment with similar concentrations of CaCl_2 and ADP.

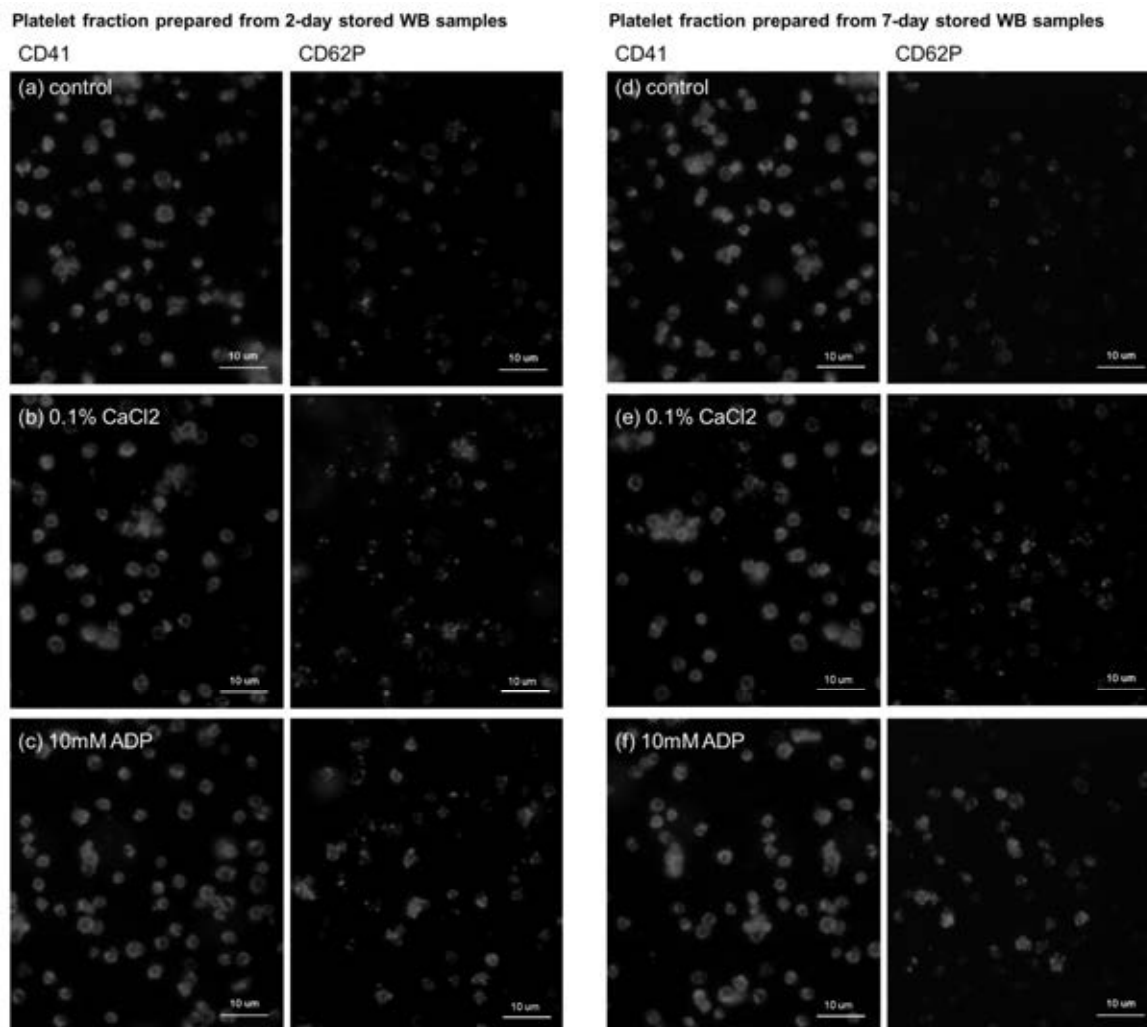


Figure 2. Immunofluorescent staining of CD41 and CD62P expressed in platelets isolated from 2-day- or 7-day-stored WB samples. (a,d) Control resting platelets; (b,e) platelets stimulated by 0.1% CaCl_2 for 15 min; and (c,f) platelets stimulated by 10 mM ADP for 15 min. The platelets were derived from the same donor and were distributed with almost the same density in all the dishes (views).

Similar observations were made during quantitative FCM analysis (Figure 3). In terms of elevated CD62P expression levels, platelets' responsiveness to ADP or CaCl_2 stayed at constant levels with storage time.

In the liquid fraction of WB samples, Ca^{2+} levels remained similar throughout the storage period, whereas glucose levels, mostly increased by ACD-A, decreased with storage time (Figure 4a,b). Plasma pH stayed at 7.5 ~8.0 (Figure 4c).

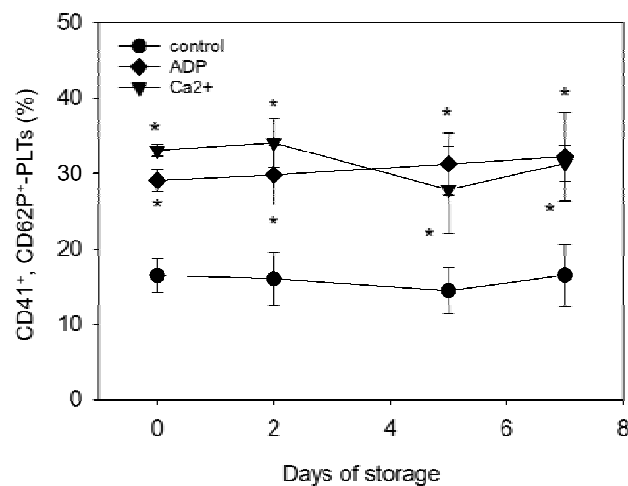


Figure 3. Flow-Cytometric (FCM) analysis of CD41- and CD62P-double-positive platelets in platelet fractions that were prepared from fresh or stored WB samples and stimulated with 10 mM ADP or 0.1% CaCl₂ for 15 min ($n = 4$). * $p < 0.05$ as compared with control platelets at the same time points. No significant differences were observed in time-course changes.

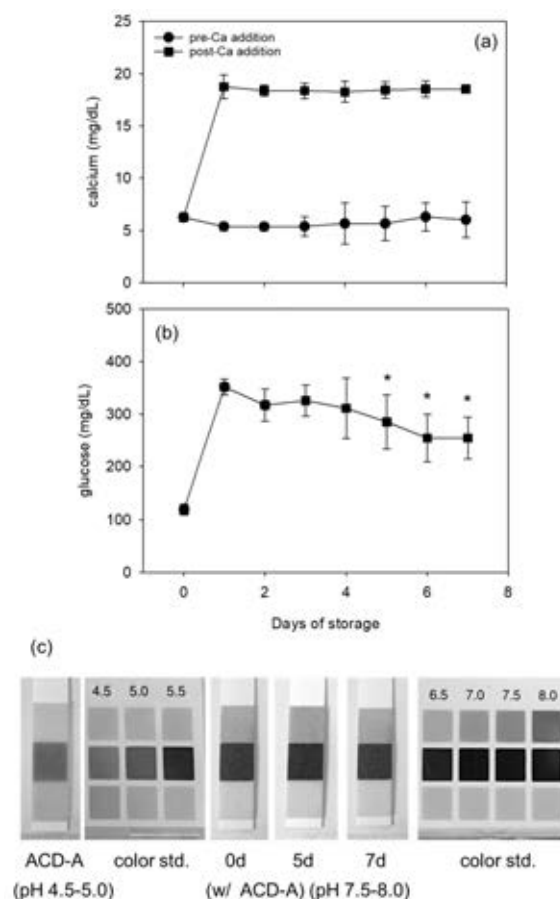


Figure 4. Stable Ca²⁺ (a) and glucose levels (b) and pH (c) of fresh and stored WB samples. Because stored WB samples contained ACD-A as an anticoagulant, CaCl₂ was added to the samples for PRF clot formation. Ca²⁺ levels were determined before and after the addition of CaCl₂. Glucose levels were determined in WB samples before the addition of CaCl₂. * $p < 0.05$ as compared with the individual control levels on day 1 ($n = 8$).

3.2. Time-Dependent Changes in the Quality of The Resultant PRFM Samples

Storage time did not substantially affect the visual appearance, size, or serum retention of PRFMs prepared from stored WB samples (Figure 5). However, fibrin fibers formed in these PRFMs became somewhat thinner with time (Figure 6).

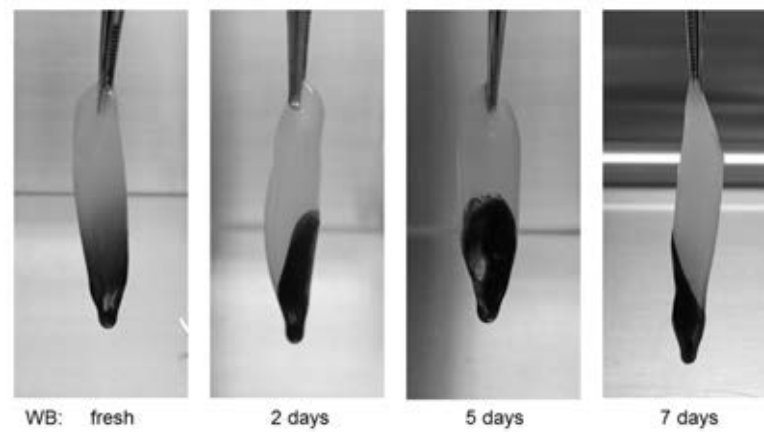


Figure 5. Visual appearance of platelet-rich fibrin-like matrixes (PRFMs) prepared from WB samples stored for the indicated periods. WB samples were simultaneously collected from the same donor. Similar PRFM samples were obtained from three other experiments.

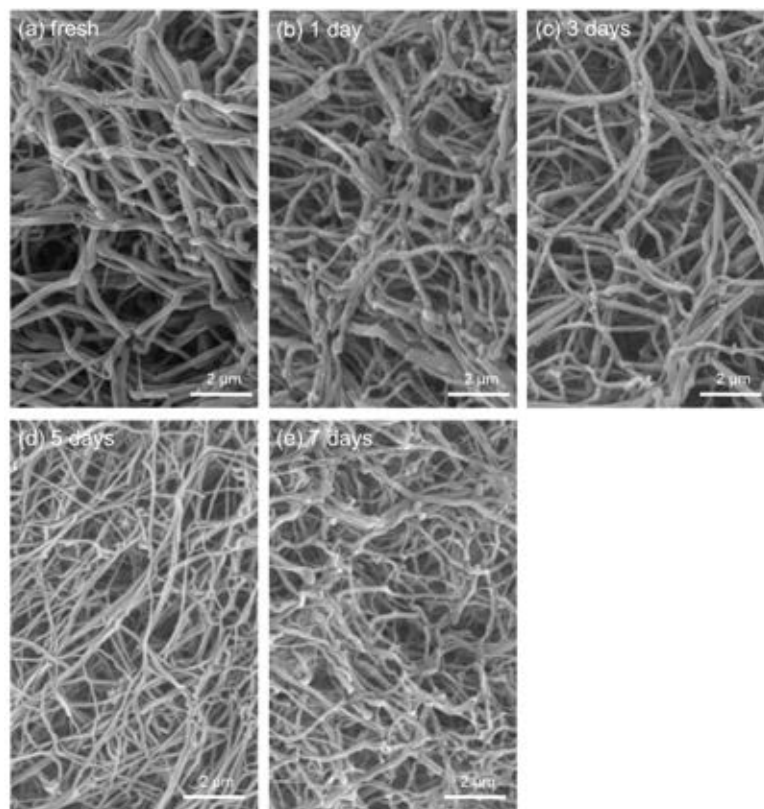


Figure 6. Scanning electron microscopy (SEM) images of fibrin fibers formed in PRFMs prepared from WB samples stored for the indicated periods. WB samples were simultaneously collected from the same donor. Similar findings were obtained in three other experiments.

PDGF-BB levels in the extracts of the resulting PRFM samples significantly decreased during the initial 3 days but recovered to control levels thereafter (Figure 7).

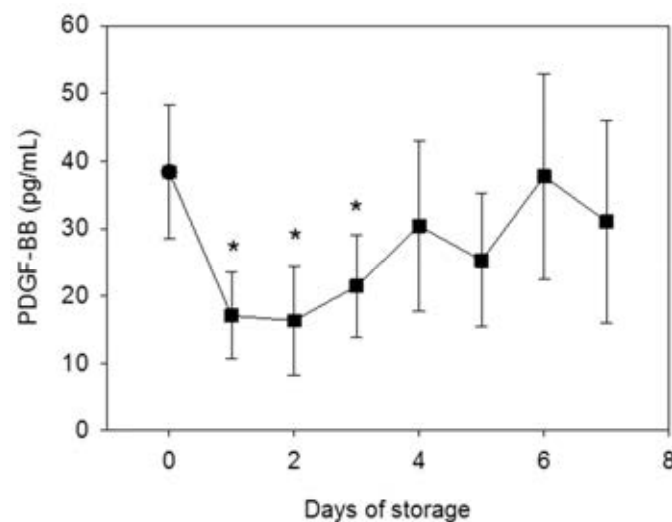


Figure 7. Time-dependent changes in the concentration of PDGF-BB extracted from PRFM samples that were prepared from stored WB samples and compressed to squeeze out PRFM exudates. * $p < 0.05$ as compared with fresh WB samples as controls ($n = 8$).

4. Discussion

The biochemical mechanisms underlying different phases of platelet activation, including adhesion, shape change, the granule release reaction, and aggregation, have been well delineated [18]. To treat specific diseases, such as thrombocytopenia, functionally complete platelets are required. However, in the PRFM used for regenerative therapy, platelets are only required to aggregate in response to Ca^{2+} and/or thrombin, to release growth factors, and to support clot formation. In our previous study [7], we demonstrated that short-term storage does not influence the minimally required platelet functions or quality of the PRFM. The aim of this study was to investigate the possible expiry limit for the storage of PRFM. In general [19], the storage of platelets for clinical use is limited to a maximum of 5 days. Consequently, we did not extend the storage period to >7 days, and we assessed the quality of PRFMs prepared from stored WB samples.

Both RBC and WBC counts tended to gradually, but not significantly, decrease with storage time, whereas platelet numbers did not. Regarding the time-dependent changes in Ca^{2+} , glucose, and PDGF-BB levels, as previously demonstrated [7], PDGF-BB levels in PRFMs prepared from WB samples stored for 1–3 days were significantly lower than those of fresh WB samples. Nonetheless, with increasing storage time, PDGF-BB levels recovered to those of the freshly prepared PRFM. Only glucose levels changed with time; they decreased with increasing storage time, and at 5 days and later, they were significantly lower than those of the ACD-treated WB samples on day 1.

It is generally accepted that adequate oxygen supply is needed to increase platelet viability in platelet concentrates because oxygen reduces their glucose consumption and lactate production [20,21]. It is known that even under the improved storage conditions, platelets gradually lose their function, a phenomenon that is called the storage lesion [22]. Furthermore, it was recently demonstrated that growth factors in PRP degrade in the course of storage at 22 °C [23]. Therefore, Bausset et al. recommend injecting PRP within 3 h after preparation to avoid the loss of efficacy [24]. There is an opposite viewpoint, that PRP for tissue regeneration can be stored for at least 5 days [25].

In the present study, gas-impermeable plastic tubes were used for WB preservation, so that blood cell viability can be maintained mainly by glycolysis (as explained elsewhere [26,27]) of glucose provided by the ACD-A solution [26,27] after depletion of remaining oxygen. In this case, even though

platelets are not concentrated as highly as platelet concentrates for storage, it is possible that RBCs in cooperation with platelets produce lactate and significantly decrease pH. On the other hand, plasma pH of the stored WB samples remained constant at ~6.5 under our preservation conditions. As a result, platelets could be preserved well, judging by the finding that the ability of the platelets—isolated from 7-day-stored WB samples—to respond to Ca^{2+} and ADP challenges was mostly similar to that of platelets obtained from the WB samples following short-term storage. A possible explanation for this successful preservation may be suppression of cell metabolism by citrate-dependent Ca^{2+} chelation: platelet activation is known to be prevented by citrate [28], whereas it is also possible that RBC activity can be reduced through inhibition of Ca^{2+} -mediated cellular functions [29] by Ca^{2+} chelation.

Because WBC-depleted transfusion is necessary to avoid WBC-mediated adverse reactions, particularly in allogeneic blood transfusions [30], the lifespan of WBCs in vitro has not been clearly described in the literature: approximate lifespans of circulating RBCs, platelets, neutrophils, eosinophils, and B cells are reported to be 120, 10, 1–5, and 2–5 days and 4–7 weeks, respectively [31]. Accordingly, granulocytes (large components of WBCs) may have the shortest survival period in vitro. In contrast, lymphocytes, which constitute the small components of WBCs, and RBCs may survive longer than can other blood cell types in vitro. Consistent with these standard lifespans, our present findings indicate that the percentage of large WBCs decreased with time. Although WBC counts did not significantly decrease within 7 days, it cannot be ruled out that the automatic hematology analyzer, which uses particle size differences for calculations, may have detected and counted WBCs that were reduced in size, probably by apoptosis.

The thickness of fibrin fibers of PRFM samples gradually decreased with time, probably due to degradation of coagulation factors, a reduction in their enzymatic activity, or a decline of platelet functions. Therefore, it can be hypothesized that PRFMs composed of thinner fibrin fibers may be easily susceptible to degradation and may release growth factors faster than do fresh WB samples. Nevertheless, fibrin fibers observed in fibrin clots that were prepared from fresh or frozen platelet-poor plasma by the addition of thrombin were considerably thinner, and their cross-link density was considerably higher relative to stored WB samples [7]. In our preliminary study, with a limited number of WB samples, the degradation assay involving a trypsin and EDTA solution failed to detect significant differences in PRFMs prepared from long-term-stored and fresh WB samples (data not shown). We believe that the PRFM prepared from WB samples stored long-term can be an alternative option for regenerative therapy in clinical settings.

Although blood transfusion studies have established standard protocols for the storage of WB samples [32,33], the time-dependent reduction in WBC counts may result in weakened bactericidal effects [34]. In addition, the possibility that autolysis of WBCs can trigger degradation of specific proteins, which in turn can influence PRFM formation, cannot be ruled out. Consequently, to validate the clinical use of such a PRFM, its safety and efficacy should be assessed further in experimental models based on relatively large animals.

5. Conclusions

The PRFM is conventionally prepared onsite; however, it would be convenient if this material were prepared several days later. We demonstrated that a clinically applicable PRFM can be prepared from WB samples that are stored for up to 7 days by the addition of appropriate amounts of Ca^{2+} . This method can make the treatment schedule more flexible and benefit both the patients and physicians or dentists involved in regenerative therapy with the PRFM. Although the period of WB sample storage may be further extended by improving several conditions, we would recommend using a fresh autologous PRFM prepared onsite as the first choice and the PRFM prepared from stored autologous WB samples as the second choice. To minimize the possible loss of efficacy and unidentified or unpredictable risks, it would be better to utilize the stored autologous WB samples as soon as possible, at least within a week in accordance with the national guidelines [6].

Author Contributions: Hideo Kawabata, Kazushige Isobe, Taisuke Watanabe and Tomoyuki Kawase conceived and designed the study, performed the experiments, and wrote the manuscript. Kazushige Isobe, Toshimitsu Okudera, Masayuki Nakamura, Masashi Suzuki, Jietsu Ryu, Yutaka Kitamura, and Kazuhiro Okuda performed the experiments and data analysis. Hajime Okudera and Koh Nakata participated in manuscript preparation. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kawase, T. Platelet-rich plasma and its derivatives as promising bioactive materials for regenerative medicine: Basic principles and concepts underlying recent advances. *Odontology* **2015**, *103*, 126–135. [CrossRef] [PubMed]
2. Bai, M.Y.; Wang, C.W.; Wang, J.Y.; Lin, M.F.; Chan, W.P. Three-dimensional structure and cytokine distribution of platelet-rich fibrin. *Clinics* **2017**, *72*, 116–124. [CrossRef]
3. Marrelli, M.; Tatullo, M. Influence of PRF in the healing of bone and gingival tissues. Clinical and histological evaluations. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2013**, *17*, 1958–1962. [PubMed]
4. Kawase, T.; Watanabe, T.; Okuda, K. Platelet-rich plasma and its derived platelet concentrates: What dentists involved in cell-based regenerative therapy should know (in Japanese). *Nihon Shishubyo. Gakkaikaishi.* **2017**, *59*, 68–72. [CrossRef]
5. Isobe, K.; Suzuki, M.; Watanabe, T.; Kitamura, Y.; Suzuki, T.; Kawabata, H.; Nakamura, M.; Okudera, T.; Okudera, H.; Uematsu, K.; et al. Platelet-rich fibrin prepared from stored whole-blood samples. *Int. J. Implant. Dent.* **2017**, *3*, 6. [CrossRef] [PubMed]
6. Kreuger, A.L.; Caram-Deelder, C.; Jacobse, J.; Kerkhoffs, J.L.; van der Bom, J.G.; Middelburg, R.A. Effect of storage time of platelet products on clinical outcomes after transfusion: A systematic review and meta-analyses. *Vox Sang.* **2017**, *112*, 291–300. [CrossRef] [PubMed]
7. Isobe, K.; Watanabe, T.; Kawabata, H.; Kitamura, Y.; Okudera, T.; Okudera, H.; Uematsu, K.; Okuda, K.; Nakata, K.; Tanaka, T.; et al. Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). *Int. J. Implant. Dent.* **2017**, *3*, 17. [CrossRef] [PubMed]
8. Masuki, H.; Okudera, T.; Watanabe, T.; Suzuki, M.; Nishiyama, K.; Okudera, H.; Nakata, K.; Uematsu, K.; Su, C.Y.; Kawase, T. Growth factor and pro-inflammatory cytokine contents in PRP, plasma rich in growth factors (PRGF), advanced-platelet-rich fibrin (A-PRF) and concentrated growth factors (CGF). *Int. J. Implant. Dent.* **2016**, *2*, 19. [CrossRef] [PubMed]
9. Watanabe, T.; Isobe, K.; Suzuki, T.; Kawabata, H.; Nakamura, M.; Tsukioka, T.; Okudera, T.; Okudera, H.; Uematsu, K.; Okuda, K.; et al. An Evaluation of the Accuracy of the Subtraction Method Used for Determining Platelet Counts in Advanced Platelet-Rich Fibrin and Concentrated Growth Factor Preparations. *Dent. J.* **2017**, *5*, 7. [CrossRef]
10. Rodella, L.F.; Favero, G.; Boninsegna, R.; Buffoli, B.; Labanca, M.; Scari, G.; Sacco, L.; Batani, T.; Rezzani, R. Growth factors, CD34 positive cells, and fibrin network analysis in concentrated growth factors fraction. *Microsc. Res. Tech.* **2011**, *74*, 772–777. [CrossRef] [PubMed]
11. Kobayashi, M.; Kawase, T.; Horimizu, M.; Okuda, K.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals* **2012**, *40*, 323–329. [CrossRef] [PubMed]
12. Kobayashi, M.; Kawase, T.; Okuda, K.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. In vitro immunological and biological evaluations of the angiogenic potential of platelet-rich fibrin preparations: a standardized comparison with PRP preparations. *Int. J. Implant. Dent.* **2015**, *1*, 31.
13. Nishiyama, K.; Okudera, T.; Watanabe, T.; Isobe, K.; Suzuki, M.; Masuki, H.; Okudera, H.; Uematsu, K.; Nakata, K.; Kawase, T. Basic characteristics of plasma rich in growth factors (PRGF): Blood cell components and biological effects. *Clin. Exp. Dent. Res.* **2016**, *2*. [CrossRef]
14. Kawase, T.; Hayama, K.; Tsuchimochi, M.; Nagata, M.; Okuda, K.; Yoshie, H.; Burns, D.M.; Nakata, K. Evaluating the Safety of Somatic Periosteal Cells by Flow-Cytometric Analysis Monitoring the History of DNA Damage. *Biopreserv. Biobank.* **2016**, *14*, 129–137. [CrossRef] [PubMed]

15. Kawase, T.; Tanaka, T.; Nishimoto, T.; Okuda, K.; Nagata, M.; Burns, D.M.; Yoshie, H. Improved adhesion of human cultured periosteal sheets to a porous poly(L-lactic acid) membrane scaffold without the aid of exogenous adhesion biomolecules. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2011**, *98*, 100–113. [CrossRef] [PubMed]
16. Murugappa, S.; Kunapuli, S.P. The role of ADP receptors in platelet function. *Front. Biosci.* **2006**, *11*, 1977–1986. [CrossRef] [PubMed]
17. Daugirdas, J.T.; Bernardo, A.A. Hemodialysis effect on platelet count and function and hemodialysis-associated thrombocytopenia. *Kidney Int.* **2012**, *82*, 147–157. [CrossRef] [PubMed]
18. Paniccia, R.; Priora, R.; Liotta, A.A.; Abbate, R. Platelet function tests: A comparative review. *Vasc. Health Risk Manag.* **2015**, *11*, 133–148. [CrossRef] [PubMed]
19. Boold Centers of AMERICA. Platelets. Available online: <http://bca.coop/products-services/blood-products/platelets/> (assessed on 4 July 2017).
20. Wallvik, J.; Akerblom, O. Platelet concentrates stored at 22 degrees C need oxygen. The significance of plastics in platelet preservation. *Vox. Sang.* **1983**, *45*, 303–311. [CrossRef] [PubMed]
21. Racz, Z.; Hasko, F. Room temperature storage of pooled platelet concentrates in gas-permeable plastic bags for five days. *Haematologia* **1989**, *22*, 89–96. [PubMed]
22. Devine, D.V.; Serrano, K. The platelet storage lesion. *Clin Lab Med* **2010**, *30*, 475–487. [CrossRef] [PubMed]
23. Sonker, A.; Dubey, A. Determining the Effect of Preparation and Storage: An Effort to Streamline Platelet Components as a Source of Growth Factors for Clinical Application. *Transfus. Med. Hemother.* **2015**, *42*, 174–180. [CrossRef] [PubMed]
24. Bausset, O.; Giraudo, L.; Veran, J.; Magalon, J.; Coudreuse, J.M.; Magalon, G.; Dubois, C.; Serratrice, N.; Dignat-George, F.; Sabatier, F. Formulation and storage of platelet-rich plasma homemade product. *Biores. Open Access* **2012**, *1*, 115–123. [CrossRef] [PubMed]
25. Moore, G.W.; Maloney, J.C.; Archer, R.A.; Brown, K.L.; Mayger, K.; Bromidge, E.S.; Najafi, M.F. Platelet-rich plasma for tissue regeneration can be stored at room temperature for at least five days. *Br. J. Biomed. Sci.* **2017**, *74*, 71–77. [CrossRef] [PubMed]
26. Yoshida, T.; Shevkoplyas, S.S. Anaerobic storage of red blood cells. *Blood Transfus.* **2010**, *8*, 220–236. [CrossRef] [PubMed]
27. Gulliksson, H. Platelet storage media. *Vox Sang.* **2014**, *107*, 205–212. [CrossRef] [PubMed]
28. Dhurat, R.; Sukesh, M. Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J. Cutan. Aesthet. Surg.* **2014**, *7*, 189–197. [CrossRef] [PubMed]
29. Bogdanova, A.; Makhro, A.; Wang, J.; Lipp, P.; Kaestner, L. Calcium in Red Blood Cells—A Perilous Balance. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 9848–9872. [CrossRef] [PubMed]
30. Singh, S.; Kumar, A. Leukocyte depletion for safe blood transfusion. *Biotechnol. J.* **2009**, *4*, 1140–1151. [CrossRef] [PubMed]
31. How quickly do different cells in the body replace themselves? Available online: <http://book.bionumbers.org/how-quickly-do-different-cells-in-the-body-replace-themselves/> (assessed on 8 July 2017).
32. Van der Meer, P.F.; de Wildt-Eggen, J. The effect of whole-blood storage time on the number of white cells and platelets in whole blood and in white cell-reduced red cells. *Transfusion* **2006**, *46*, 589–594. [CrossRef] [PubMed]
33. Hess, J.R. Conventional blood banking and blood component storage regulation: Opportunities for improvement. *Blood Transfus.* **2010**, *8*, s9–s15. [CrossRef] [PubMed]
34. Hogman, C.F.; Gong, J.; Eriksson, L.; Hambræus, A.; Johansson, C.S. White cells protect donor blood against bacterial contamination. *Transfusion* **1991**, *31*, 620–626. [CrossRef] [PubMed]



© 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

一般社団法人 東京形成歯科研究会

【 活動報告（2016・2017 年度） 】



Tokyo Plastic Dental Society

一般社団法人 東京形成歯科研究会 施設長・理事長／国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB） チェアマン

王子歯科美容外科クリニック 総院長 医学博士 奥寺 元



先端技術は常に国民の理解と共に ～前進する先端医療を啓発の場として～

啓発運動の必要性、ただしく医療を理解することにより、医療行為が盤石なものになる。国民は医療が大切なことを理解しつつ、ほどほどの認識であるし、興味もわからない。そこで啓発の為の市民公開講座が必要なのである。我々も間髪を入れずに対処してきた。顎顔面美容口腔外科の立場から美と健康を題材にして俳優の宝田明先生や美容外科学会の梅澤文彦先生など、市民講座にて顎顔面の形態の重要性を講演していただいた。また、ボディービル世界チャンピオンの近藤一隆、84歳のボディービルダー、大相撲の元高見山親方、今回の三浦雄一郎氏の“健康寿命への飽くなき探求”などユニークな題材で先端分野において一石を投じた。



会員の成長と地位と福祉の絆を求めて

汗と努力の結晶が報われる場として、会員のスキルが上がり、当然としてその行為が診療所の信頼を構築し、個々の繁栄が約束され、はたまた結束に対してお互い助け合う手堅い友情が構築される。国際的にもフィリピン国際歯科大学や台北医学大学の客員教授に就任され、その地位を確立しています。また、満たされる生活の中からゆとりを求める事が会員の目標であるマリンスポーツやアウトドアに共に興じる事もしばしばです。やはりこれほどの活動は家族の理解が無ければなりません。家族と共にありたいと家族との寄り添いも行っております。

終わりに、

この様な多彩な活動は、現代医学の使命感から会員一人一人の努力で成り立っている。大学機関においてはその職業上で成り立っている。はたまた企業の研究機関は利権構造から成り立っている。行政の科研費などは、そのボランティア集団にはほとんど日が当たっていない。私どももこの点に如何に向かい合えばよいのかを模索していきたい。患者に直結する臨床の現場から、強く今後も主張していきたい。また最後に、この様な当研究会の活動を理解し、後に続く若き学徒が生まれることを切に願うのみである。

一般社団法人 東京形成歯科研究会 会長

古谷田歯科医院 院長

古谷田 泰夫



東京形成歯科研究会 創立35周年を迎え

東京形成歯科研究会は35周年を迎えます。迎えるに当たりまして長年支えていただきました会員各位並びにご指導ご協力を賜りました日本口腔インプラント学会の諸先生方に心より感謝申し上げます。25年ほど前に現施設長である奥寺元先生にお誘いを受け、当時黒山巖先生が会長、顧問を大里重雄先生がされていたと記憶していますが、入会をさせていただきました。その後、奥寺元先生が会長になり、年功ではない公平な会務運営とグローバルな観点からのエビデンスのあるインプラントを目指し、広く海外の著名な先生方とコンタクトを取り、皆で海外に研修へ行ったことは大変思い出深いものがあります。先生がICOIの会長に成られた頃には更に会員も増え、海外へレーザーの研修など多岐にわたる研鑽を積むべく海外研修に赴きました。「見て聞いて行って見て確認する」この精神は現在も衰えることなく若い先生方に受け継がれています。現在、東京形成歯科研究会は一般社団法人東京形成歯科研究会となり社会的責務を持った研究会となりました。知識・手術をはじめとする様々な手技の向上、新潟大学との共同研究など、“学ぶ”という環境は充実しています。未だ衰えない奥寺元施設長のブースターの先生方がどんどん成長してきています。昭和64年に最初のインプラントを行って以来、大きな問題もなく行っておられるのはこの下地の環境の中、皆と学べることができた環境にあると思っています。36・37と年を重ねるごとに会員全員で切磋琢磨し向上して行きたいと思っています。強く張った糸はいつか切れます、たまには温泉で美味しい肴で美味しい酒も楽しみたいものです。

会員の皆様、今後とも宜しく願いいたします。また日本口腔インプラント学会の諸先生方におかれましてはご指導・ご鞭撻お願い申し上げます。

一般社団法人 東京形成歯科研究会

まごころ歯科クリニック 院長

荻原 真



この度、2016年度日本口腔インプラント学会専修医試験に合格することができました。

私のような若輩者が専修医試験に合格できたのは、一重に、マンツーマンで指導して下さった奥寺俊充先生や、予演会での確なアドバイスをくださった先生方のおかげです。

日本口腔インプラント学会に入会した当初は、ただただ日々の臨床をこなしておりました。しかし、東京成歯科研修会の研修に通ううちに、奥寺先生をはじめ、多くの先生方の熱い思いに触れ、より良い臨床家を目指そうという意欲がわいてきました。日々の臨床は次第に楽しくなり、また、患者様の笑顔に接する機会も増えたように感じております。

東京成歯科研究会では、インプラントを中心に、外科、補綴、再生医療、そして歯科医師としての生きる指針を学ぶことができました。研修で学んだことは、私のこれからの歯科医師人生の宝物です。

専修医になることができましたが、学ぶべきことはまだまだ沢山あり、自分がインプラント臨床のほんの入り口に立っているにすぎないことを感じております。今後はインプラント学会専門医試験合格を目指し、ただひたむきに、日々精進していきたいと思っております。

一般社団法人 東京形成歯科研究会

テルミナ歯科クリニック

鳥村 亜矢



2016 年のケースプレゼンテーション試験を受けましたが、その際には毎月の講習会や予演会で奥寺元先生をはじめ、諸先生方に細かくご指導頂きました。

初めての試験だった為、何度か勉強会の後にご教授して頂いたのですが、お忙しい中丁寧にご指導頂き大変有難く存じます。

ポスター制作に関しても色々ご教授頂きました。

先生方から丁寧にご指導をしていただいたお陰で、試験当日は細かい質問があったのですが全部解答することが出来、大変感謝しております。

今回ケースプレゼンテーション試験を受けたことや予演会を行っていただいたことで、インプラントに関してより勉強することが出来、大変実を得ることが出来ました。

本当にありがとうございました。

その他の合格者

王子歯科・美容外科クリニック

大場 英典

一般社団法人 東京形成歯科研究会

神谷デンタルクリニック 院長

神谷 孝生



この度、平成 28 年度、日本口腔インプラント学会認定講習会を受講させていただきました、神谷デンタルクリニックの神谷孝生と申します。

神奈川歯科大学を卒業後、神奈川歯科大学附属病院と市内内の歯科医院での研修を経て、地元である愛知県へ戻り、2015 年に現在の歯科医院を新規開業致しました。

私の臨床は今まで、インプラントを積極的に取り組んでいたわけではありませんでした。

しかし、欠損歯症例を多く経験するにつれ、ブリッジにての欠損歯冠修復の限界や、有床義歯補綴における患者の私生活におけるハンディキャップを感じ、インプラント歯科治療は避けては通れない道と確信し、今回受講させて頂きました。

東京形成歯科研究会での講義、ハンズオン実習は、私の様な臨床経験の浅い人間でも非常に分かりやすく基礎の基から始めて頂き、事細かく教えて頂きました。そして、ライブオペでは、実際の現場でアシスタント、見学をさせて頂きました。ダイナミックかつスピーディなオペは芸術的で大変勉強になりました。

年間通しての受講でしたが、どの講義も内容が濃く、再度改めて拝聴、実習したい限りです。

最後になりましたが、東京形成歯科研究会の諸先生方、スタッフの方々、先輩である奥寺俊允先生、施設長であられる奥寺元先生に感謝致します。ありがとうございました。

[2016 年度 受講修了者]

荒川 勇喜 荒川歯科医院

石井 淳 辻堂太平台歯科

神谷 孝生 神谷デンタルクリニック

2016 年度 第 4 回 再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会

テーマ 再生医療新法施行 自己血由来の成長因子を用いた再生療法 ～その理論と実際～ 米国編／日本編

主催 一般社団法人 東京形成歯科研究会／国際血液・幹細胞臨床応用会議 (ISBB)

後援 (一社) 日本再生医療学会／東北口腔インプラント研究会／(一社) 日本美容外科学会／韓国美容外科醫學會

開催日程 2016 年 10 月 30 日 (日曜日) 9:30～17:00

開催場所 東京大学 医学部研究科教育研究棟 14F 鉄門記念講堂 (〒113-8654 東京都文京区本郷 7-3-1)



■講演 JACK T KRAUSER



■講演 川瀬 知之



■講演 星 和人



■パネルディスカッション

「基調講演」

- ・テーマ 多血小板血漿(PRP)由来物質における骨再生の作用機序に関する最新の考え方
講演者 川瀬 知之 (新潟大学大学院医歯学総合研究科顎顔面再建学講座歯科薬理学分野 准教授)
- ・テーマ ISBB (国際血液・幹細胞臨床応用会議) の使命と今後の再生医療への献身
講演者 蘇 正堯 ヘンリー・ヤオ・スー (国際血液・幹細胞臨床応用会議 ISBB 会長、国立陽明大学 教授)
- ・テーマ 顔面変形と再生医療
講演者 星 和人 (東京大学医学部附属病院 ティッシュエンジニアリング部・口腔外科 准教授)
- ・テーマ 最小侵襲フェースリフト
講演者 Lim Jong Hak (KAAS 韓国美容外科医学会会長)
- ・テーマ PRP、PRF の使用及び歯科インプラント再建中の幹細胞
講演者 JACK T KRAUSER (歯周外科医 President and Director of The Implant Center of the Palm Beaches)
- ・テーマ 閉経後骨粗鬆症にリリースされた幹細胞と多血小板フィブリンの再生能力：マウスにおける in vivo 研究
講演者 郭 宗甫 (台灣大學獸醫專業學院 名譽教授)

「症例報告／研究発表」

- ・テーマ 4 種の血小板濃縮液における増殖因子レベルの比較研究 - A-PRF, CGF, PRGF, PRP -
講演者 磯邊 和重 (一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事／いそべ歯科医院)
- ・テーマ PRGF を用いた臨床症例の短期予後についての考察
講演者 渡辺 泰典 (一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事／あけぼの歯科)
- ・テーマ インプラント治療における PRGF endoret の有効性と臨床応用
講演者 中村 雅之 (一般社団法人 東京形成歯科研究会／中村歯科医院)
- ・テーマ 重度の顎骨吸収症例「PRP、PRF 応用における技術に影響を与える臨床比較」
講演者 陳 建志 (陳建志牙醫診所)
- ・テーマ 骨組織再生のための多血小板フィブリンおよび骨髄由来間葉系幹細胞で官能骨移植代替物
講演者 林 明正 (Postgraduate school, College of Oral Medicine, Taipei Medical University)
- ・テーマ クマによる下顎骨骨折の一症例 ～癒合不全に対する骨髄海綿骨移植の有用性～
講演者 北村 豊 (一般社団法人 東京形成歯科研究会 相談役・理事／信州口腔外科インプラントセンター)

「パネルディスカッション」

テーマ 自己血由来の成長因子を用いた再生療法の今後の展望

パネリスト Jack T Krauser、Dr.Lim Jong Hak、川瀬 知之、高戸 毅、石川 烈、蘇 正堯、郭 宗甫

[AO / オランダ・米国 (2017年3月16～18日)]

□会場_3月17日, 川瀬先生のポスター発表後の記念撮影



□3月18日, Prof. Howard の講演



[美容外科アジアフォーラム (AFAS) / ソウル・韓国 (2017年4月15日～16日)]



[2017年度 ISBB 国際会議 / 中国・天津 (2017年10月21・22日)]

□会場_エントランス



□講演会場



公益社団法人 日本口腔インプラント学会第 36 回関東・甲信越支部学術大会 JSOI 認定研修施設セミナー

演題名 “美容口腔外科への理論と実際” ～顎骨の保存と再生における顔貌とのかかわり～

講演者 奥寺 元 (一社) 東京形成歯科研究会施設長・理事長/ISBB チェアマン

座 長 一般社団法人東京形成歯科研究会 副会長 鈴木 正史/一般社団法人東京形成歯科研究会 理事 菊池 龍介

コメンテーター 宝田 明 (俳優)

日 時 2017 年 2 月 11 日 (土・祝) 11:00~11:50

会 場 京王プラザホテル 4F「花 A」 〒160-8330 東京都新宿区西新宿 2-2-1

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会

□講演

□講演



第 47 回公益社団法人日本口腔インプラント学会学術大会 JSOI 研修施設イブニングセッション

演題名 セメント固定、スクリュー固定に頼らない患者可撤式電鍍上部構造の意義と臨床 実演供覧

講 師 林 昌二 神奈川歯科大学 歯学博士

奥寺 元 ISBB チェアマン/一般社団法人東京形成歯科研究会施設長・理事長 医学博士

座 長 鈴木 正史 (一社) 東京形成歯科研究会 副会長/銀座柳通り歯科クリニック

相澤 八大 (一社) 東京形成歯科研究会 理事/あいざわ歯科クリニック

日 時 2017 年 9 月 23 日(土) 17:10~18:00

会 場 仙台国際センター第 4 会場 会議棟 2 階 萩 〒980-0856 仙台市青葉区青葉山無番地

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会

□講演者

□座長



○口頭発表

国 内

4種の血小板濃縮液における増殖因子レベルの比較研究 - A-PRF, CGF, PRGF, PRP

発表者 磯邊 和重

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2016_011.pdf

学 会 2016年度 第4回 再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会

日 程 2016年 10月 30日

場 所 東京大学 医学部研究科教育研究棟 14F 鉄門記念講堂

PRGFを用いた臨床症例の短期予後についての考察

発表者 渡辺 泰典

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2016_012.pdf

学 会 2016年度 第4回 再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会

日 程 2016年 10月 30日

場 所 東京大学 医学部研究科教育研究棟 14F 鉄門記念講堂

インプラント治療における PRGF endoret の有効性と臨床応用

発表者 中村 雅之

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2016_013.pdf

学 会 2016年度 第4回 再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会

日 程 2016年 10月 30日

場 所 東京大学 医学部研究科教育研究棟 14F 鉄門記念講堂

クマによる下顎骨骨折の一症例 ～癒合不全に対する骨髄海綿骨移植の有用性～

発表者 北村 豊

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2016_014.pdf

学 会 2016年度 第4回 再生医療 血液臨床応用 国際特別講演会

日 程 2016年 10月 30日

場 所 東京大学 医学部研究科教育研究棟 14F 鉄門記念講堂

持続性のある定期メンテナンスがインプラントの長期安定性を導いた症例分析について—330人のメンテナンス統計処理—

発表者 江崎 友大

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2016_015.pdf

学 会 公益社団法人日本口腔インプラント学会 第36回近畿北陸支部学術大会

日 程 2016年 12月 17・18日

場 所 富山国際会議場

上顎無歯顎患者に即時荷重型インプラント治療を適用した5年経過症例

発表者 江俣 壮一

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_001.pdf

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第36回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2017年2月11日

場 所 京王プラザホテル (東京都新宿区)

歯科矯正用アンカースクリューを用いたインプラント補綴スペースの確保についての臨床的検討

発表者 田 昌守

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_002.pdf

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第36回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2017年2月11日

場 所 京王プラザホテル (東京都新宿区)

PRP等を応用した顎顔面形態修正処置1症例 ～顔貌形態測定とGBR角度の変化～

発表者 増木 英郎, 磯邊 和重, 田中 かずさ, 江崎 友大, 鈴木 富士雄, 鈴木 正史, 木下 三博, 奥寺 元

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_003.pdf

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第36回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2017年2月11日

場 所 京王プラザホテル (東京都新宿区)

重症度な歯周疾患に応用した可撤式エレクトロフォーミングの8年後の経過症例

発表者 相澤 八大, 鳥村 亜矢, 青木 健, 古谷田 泰夫, 荻原 道, 木村 博光, 奥寺 元, 月居 健一

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_004.pdf

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第36回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2017年2月11日

場 所 京王プラザホテル (東京都新宿区)

4タイプの血小板濃縮材料調製における遠心条件がおよぼす血球分布への影響

発表者 ○渡辺 泰典1, 中村 雅之1, 川端 秀男1, 磯邊 和重1, 月岡 庸之1, 奥寺 元1, 川瀬 知之2

1:東京形成歯科研究会, 2:新潟大学大学院歯科薬理学分野

抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_005.pdf

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第36回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2017年2月11日

場 所 京王プラザホテル (東京都新宿区)

血小板濃縮材料(A-PRF, CGF, PRGF, PRP)に含まれる増殖因子レベルの比較研究

発表者 ○磯邊和重 1, 渡辺泰典 1, 川端秀男 1, 奥寺俊允 1, 奥寺 元 1, 上松晃也 2, 中田 光 3, 川瀬知之 4
1:東京形成歯科研究会 2:新潟大学医歯学総合病院インプラント科 3:新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター
4:新潟大学大学院歯科薬理学分野
抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_006.pdf
学 会 第 16 回日本再生医療学会総会
日 程 2017 年 3 月 7～9 日
場 所 仙台国際センター 会議棟・展示棟

十分な初期治療と長期定期メンテナンスがインプラントの長期安定性を導いた症例分析について

発表者 江崎 友大
抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_007.pdf
学 会 第 47 回（公社）日本口腔インプラント学会学術大会
日 程 2017 年 9 月 22～24 日
場 所 仙台国際センター（宮城県仙台市）

Advanced-platelet-rich fibrin と Concentrated growth factor の機械的強度，分解性，微細構造の比較 研究

発表者 ○磯邊和重 1, 北村豊 1, 川端秀男 1, 中村雅之 1, 辻野哲弘 1, 奥寺元 1, 川瀬知之 2
1:一般社団法人東京形成歯科研究会、2:新潟大学大学院歯科薬理学分野
抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_008.pdf
学 会 第 47 回（公社）日本口腔インプラント学会学術大会
日 程 2017 年 9 月 22～24 日
場 所 仙台国際センター（宮城県仙台市）

歯牙各種粉碎器使用における粒度分布測定分析

発表者 ○豊田寿久、山崎良和、柳川剛、磯邊和重、秋知明、鈴木泰二、奥寺俊允、奥寺元
抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_009.pdf
学 会 第 47 回（公社）日本口腔インプラント学会学術大会
日 程 2017 年 9 月 22～24 日
場 所 仙台国際センター（宮城県仙台市）

骨再生の Scaffold として採取骨・歯の新各種粉碎器の比較検討

発表者 ○奥寺元、豊田寿久、鈴木富士雄、鈴木泰二、秋知明、鳥村亜矢、江崎友大、奥寺俊允
抄 録 (PDF) ダウンロード http://www.tpdimplant.com/download/member/publish_kokunai/2017_010.pdf
学 会 第 47 回（公社）日本口腔インプラント学会学術大会
日 程 2017 年 9 月 22～24 日
場 所 仙台国際センター（宮城県仙台市）

インプラント上部構造に応用した電鍍外冠の維持力分析

発表者 ○古谷田泰夫※1, 相澤八大※1, 西山和彦※1, 大八木章好※1, 月居健一※2, 佐藤七施※2, 奥寺元※1,
※1 一般社団法人東京形成歯科研究会 ※2 王子デンタルラボラトリー

抄 録 (PDF) ダウンロード

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第 37 回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2018 年 2 月 11 日 (日) ~12 日 (月・祝)

場 所 鶴見大学記念館 (神奈川県横浜市鶴見区 2-1-3)

短期保存血液から調製した Platelet-rich fibrin は新鮮血由来のものと同等の性能を持つ

発表者 ○渡辺泰典 1), 川端秀男 1), 磯邊和重 1), 辻野哲弘 1), 古谷田泰夫 1), 北村豊 1), 奥寺元 1), 川瀬知之 2)
1) 一般社団法人東京形成歯科研究会 2) 新潟大学

抄 録 (PDF) ダウンロード

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第 37 回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2018 年 2 月 11 日 (日) ~12 日 (月・祝)

場 所 鶴見大学記念館 (神奈川県横浜市鶴見区 2-1-3)

各種 PRF 成形デバイスの臨床的比較検討

発表者 ○柳時悦※1, 鈴木正史※1, 磯邊和重※1, 北村豊※1, 奥寺俊允※1, 蘇正堯※2, 奥寺元※1, 鈴木富士雄※1
※1 一般社団法人東京形成歯科研究会 ※2 台湾 国立陽明大学

抄 録 (PDF) ダウンロード

学 会 (公社) 日本口腔インプラント学会 第 37 回関東・甲信越支部学術大会

日 程 2018 年 2 月 11 日 (日) ~12 日 (月・祝)

場 所 鶴見大学記念館 (神奈川県横浜市鶴見区 2-1-3)

研究題目 血小板濃縮生体材料の生物活性評価と調製法の最適化

研究目的及び内容

近年、自家血小板濃縮生体材料として PRP やこれを改良した PRF や PRGF などいくつかの形態が開発され、歯槽骨再生治療に応用され高い治療効果を挙げている。本研究では、これらさまざまな形態の血小板濃縮生体材料の生化学的性状を明らかにするとともに生体活性を比較評価する。これらの検討を通して、骨再生に最適化した調製法を確立し、臨床応用を支援する科学的根拠を与える。

研究期間（予定） 契約締結日から平成 32 年 3 月 31 日まで

研究実施場所

大学 新潟大学医歯学総合病院生命科学医療センター 輸血再生医療部門細胞プロセッシング室
企業等 一般社団法人東京形成歯科研究会

企業等研究員（所属・職・氏名） ※申請書内容 ※実験参加者 別途

企業等にて研究 東京形成歯科研究会 奥寺 元、奥寺 俊允、西山 和彦、鈴木 正史、渡辺 泰典
（研究における役割）各種血小板濃縮生体材料を調製し、それらに含まれる増殖因子濃度および生体活性を測定する。

希望する研究担当教員

（所属・職・氏名）医歯学総合病院 生命科学医療センター 教授 中田光
（研究における役割）各種血小板濃縮生体材料の性状を明らかにするとともに調製法の最適化し、効果的投与法の確立につなげる。

2016 年度 テーマ PRF/CGF の物性解析

研究指導者 川瀬 知之（新潟大学大学院医歯学研究科 准教授）

研究者・実験参加者 磯辺 和重、渡辺 泰典、中村 雅之、月岡 庸之、川端 秀男、鈴木 泰二、奥寺 俊允、奥寺 元、
田中 かずさ、渡辺 孝夫、北村 豊、柳 時悦 ※順不同

参考になる {Q&A} がホームページにアップ（下記・アドレス）されています。

http://www.tpdimplant.com/member/project_kokunai_archive2016.php#kokunai_001

■第 3 回 実験／研究経過報告

日 程 平成 28 年 11 月 19 日（土） 会 場 新潟大学 五十嵐キャンパス

☐講義

☐実験

☐終了証授与



2017年度 東京形成歯科研究会×新潟大学「共同研究」

研究指導者 川瀬 知之（新潟大学大学院医歯学研究科 准教授）

研究者・実験参加者 磯邊 和重、渡辺 泰典、奥寺元、渡辺孝夫、川端 秀男、北村豊、柳 時悦、鈴木 正史、辻野 哲弘、
相澤 八大、豊田 寿久、大八木 章好、古谷田 泰夫 ※順不同

○ 前期 テーマ Ca 添加による PRP クロット形成における血小板活性化の定量的評価

■前期 第1回 実験・講義

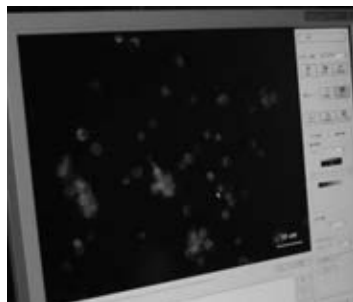
日 程 平成 29 年 6 月 18 日（日） 会 場 新潟大学 五十嵐キャンパス、新潟駅南キャンパス『ときめいと』

■前期 第2回 実験・講義

日 程 平成 29 年 7 月 23 日（日） 会 場 新潟大学 五十嵐キャンパス



□実験



□実験



□ディスカッション

○ 後期 テーマ Ca が血小板の形態(活性)に及ぼす影響:SEM による観察

■後期 第1回 実験・講義

日 程 平成 29 年 10 月 15 日（日） 会 場 新潟大学 五十嵐キャンパス



□講義



□実験

■後期 第2回 実験・講義

日 程 平成 29 年 11 月 12 日（日） 会 場 新潟大学 五十嵐キャンパス



□実験



□実験



□実験

[JSOI 認定講習会 ／ LIVE サージェリー・Hands On]

2016 年度 第 4 回 再生医療 血液臨床応用 「美容外科処置・ライブサージェリー」

平成 28 年度第 7 回 一般社団法人東京形成歯科研究会主催 公益社団法人日本口腔インプラント学会認定講習会

テーマ 「美容外科医による PRP 等を使用した美容外科処置・ライブサージェリー」 歯科と美容外科とのコラボレーション

日 時 2016 年 10 月 29 日（土曜日）13:00～17:00

会 場 王子歯科美容外科クリニック／オクデラメディカルインスティテュート(東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ)

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会／国際血液・幹細胞臨床応用会議 (ISBB)

後 援 一般社団法人日本美容外科学会／韓国美容外科醫學會(Korea Academy of Aesthetic Surgery and Medicine)

「講義」臨床で役立つ PRP に関する FAQ 川瀬 知之（新潟大学大学院医歯学総合研究科准教授）

「デモ（動画解説）」PRGF の調整デモ 渡辺 泰典（一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事）

「採血／調整」採血と静脈確保点滴モニター管理 2 症例 北村 豊（一般社団法人 東京形成歯科研究会 相談役・理事）

PRP 調整 (YCELL BIO PRP キット使用※(株)ウィステリア提供) (採血終了後) 増木 英郎・渡辺 泰典 (補助)

「ライブサージェリー」 “PRP 応用によるファイバーリフト” 執刀医 Dr.Lim Jong Hak ／ 患者 女性 A

“PRP、ヒアルロン酸 注入による LIFT” 執刀医 Dr.Lim Jong Hak ／ 患者 女性 B

“PRP、ヒアルロン酸 注入による LIFT” 執刀医 Dr.Lim Jong Hak ／ 患者 男性

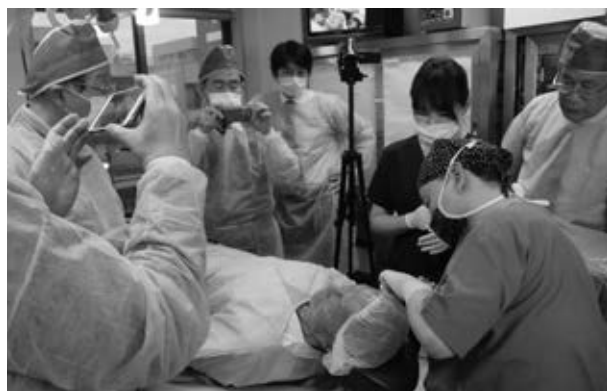
「術後示説／ディスカッション」 執刀医 Dr.Lim Jong Hak、奥寺 元、 他



□PRP 調整



□採血



□オペ



□ディスカッション

 レポート 2016 年度第 4 回 再生医療 血液臨床応用「国際特別講演会」&「美容外科処置・ライブサージェリー」に参加して

一般社団法人 東京形成歯科研究会 理事

K.i 歯科（東京都）

菊池 龍介



今年で 4 回目となる血液応用再生医療の「国際特別講演会」に先立ち、韓国美容外科医学会会長のリム・ジョンハク（Lim Jong Hak）氏による歯科と美容外科のコラボレーションのライブオペが王子歯科美容外科クリニックで 10 月 29 日におこなわれた。

施術の目的は、顔貌にかかわる顎骨再生と口腔機能が改善された 3 名の患者の加齢による顔面のたるみの除去であった。同量の PRP を混和したヒアルロン酸の皮下注射と特殊糸による牽引を見学した。美容面の改善は顕著であり、心理面への好影響がうかがわれた。

Dr.Lim によれば、PRP によって、刺入口の治癒促進と美容効果の大幅な延長がなされたという。ちなみに Dr.Lim は日本の医科大学を卒業し医師免許取得した後、韓国・中国の医師免許を取得している。氏は韓国を代表する美容外科医で、韓国では PRP の臨床応用で第一人者でもある。AFAS (Asia Forum for Aesthetic Surgery & Medicine) を主宰し、過去 10 年にわたり顎顔面口腔外科領域と連携を取られてきた。東京形成歯科研究会の奥寺はその学会の学術委員として顎顔面口腔外科領域と血液臨床応用再生治療のセッションを任されている。その縁で今回のライブオペと講演が実現したという。

ところで、東京形成歯科研究会（代表：奥寺元）は、インプラント治療を「顎骨の保全・再生」と位置づけ、確実性と治癒促進を高めるために PRP をいち早く導入している。自己血液を応用した PRP は再生医療の範疇とされ、現在は、海外では特に陽明大学と国内では新潟大学との共同研究へと発展しており論文を出している。

今回の歯科と美容外科のコラボレーションの意義は、歯科医療の目標が機能改善の先にあることを確認したことだ。奥寺らは、かねてより「顎骨の保全と美容」というテーマのもとに歯科医療の方向性を提言してきた。「顎骨の保全」は、咀嚼筋や顎関節の健康を維持するための咬合が鍵となる。その本質は下顎位の問題であろう。さらに、口腔機能と下顔面の形態は裏表の関係にあるので、患者が機能の良し悪しを形、すなわち「美容」として捉えることは自然な流れであると考えた。

また、来年の 4 月には韓国で AFAS が開催されるが、この学会から私にも講演依頼を頂いており、ぜひとも参加したいと思う。

2017 年度 第 1 回「LIVE オペ」 ※第 3 種再生医療等提供機関対象「研修会」(TPDS／ISBB 共催) 同時開催

「20 年前のサイナスリフトを含めた FULL 症例のインプラント上部構造脱落による粘膜硬結増殖による軟組織処置と MUCOGINGIVAL SURGERY」

執刀医 慶應義塾大学医学部歯科・口腔外科学教室 准教授 河奈 裕正

日 時 2017 年 4 月 21 日 (金) 17:45～

会 場 王子歯科美容外科クリニック／オクデラメディカルインスティテュート(東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ)

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会 (TPDS) ／国際血液・幹細胞臨床応用会議 (ISBB)

□LIVE オペ



平成 29 年度 第 6 回一般社団法人東京形成歯科研究会 主催公益社団法人日本口腔インプラント学会 認定
「講習会」 「Hands-On」

「GBR の戦略とその基本手技・・・講義／実習・・・」

講 師 医療法人社団 庸明会 つきおか歯科医院／(一社) 東京形成歯科研究会 副会長 月岡 庸之

日 時 2017 年 10 月 1 日 (日) 10:00～16:30

会 場 王子歯科美容外科クリニック／オクデラメディカルインスティテュート(東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ)

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会 (TPDS) ／国際血液・幹細胞臨床応用会議 (ISBB)

□デモ

□実習



平成 29 年度 第 8 回一般社団法人東京形成歯科研究会 主催公益社団法人日本口腔インプラント学会 認定
「講習会」「Hands-On」

「外科基本手技／Hands-On 切開縫合実習」

講 師 王子歯科美容外科クリニック 副院長／（一社）東京形成歯科研究会 副会長 奥寺 俊允

日 時 2017 年 11 月 26 日（日）10:00～17:00

会 場 王子歯科美容外科クリニック／オクデラメディカルインスティテュート(東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ)

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会（TPDS）／国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB）

□講義



□実習



平成 29 年度 第 9 回東京形成歯科研究会／東北口腔インプラント研究会 主催

公益社団法人日本口腔インプラント学会 認定「講習会」「Hands On」～講演／資料館見学・解剖実習／Hands-On～

「解剖学（インプラントと歯科再生医療の Morphology※形態学）（仮題）」「解剖学とサイナスリフト（仮題）」

神奈川歯科大学大学院口腔科学講座・歯科形態学（口腔解剖）教授 松尾 雅斗

「上顎洞底挙上術（仮題）」

吉祥寺セントラルクリニック 洪（徳山） 性文

一般社団法人東京形成歯科研究会 副会長／神奈川歯科大学大学院口腔科学講座・歯科形態学(口腔解剖)特任講師 奥寺 俊允

日 時 2017 年 12 月 16 日（土）15:00～・17 日（日）9:00～

会 場 神奈川歯科大学 神奈川県横須賀市稲岡町 82 番地

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会（TPDS）／国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB）

□12 月 16 日（土）



□12 月 17 日（日）



平成 29 年度 第 10 回一般社団法人東京形成歯科研究会 主催公益社団法人日本口腔インプラント学会 認定
「講習会」「LIVE オペ」

講 演 「審美領域におけるインプラント治療戦略」

講 師 吉樹デンタルクリニック 院長 林 丈裕

講 演／LIVE オペ 「上顎前歯部欠損症例に対するインプラント埋入術」

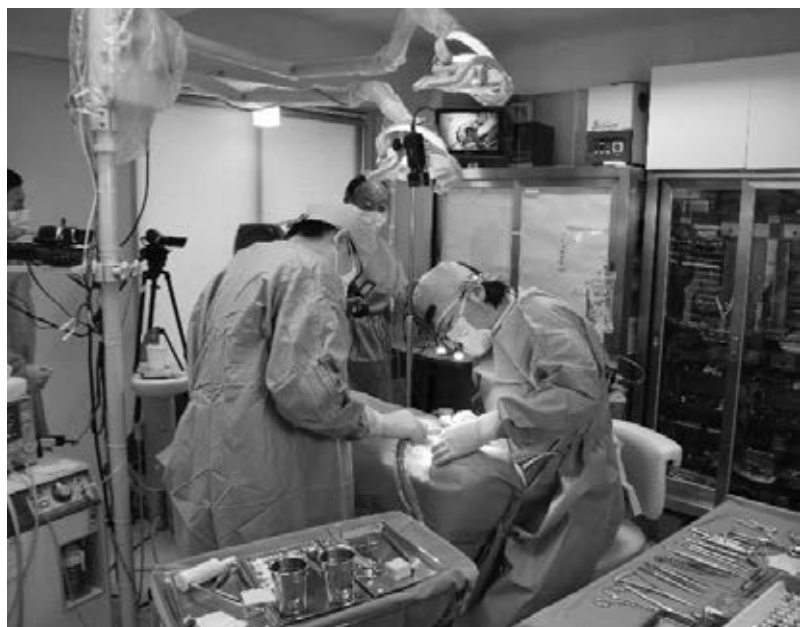
講 師 王子歯科美容外科クリニック 副院長／（一社）東京形成歯科研究会 副会長 奥寺 俊允

日 時 2018 年 1 月 28 日（日）10:00～

会 場 王子歯科美容外科クリニック／オクデラメディカルインスティテュート(東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ)

主 催 一般社団法人東京形成歯科研究会（TPDS）／国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB）

□LIVE オペ



□LIVE オペ



□LIVE オペ



□ディスカッション



レポート 平成 29 年度 第 10 回 TPDS 主催 JSOI 認定講習会・LIVE オペ に参加して

一般社団法人 東京形成歯科研究会

中延駅前歯科（東京都）

岡 吉孝



本日（2018 年 1 月 28 日）は、所属する東京形成歯科研究会の日本口腔インプラント学会認定講習会に参加してきました。

午前中は、東京都港区ご開業 吉樹デンタルクリニック院長 林 丈裕先生に「審美領域におけるインプラント治療戦略」と題してご講演いただきました。

10 年以上前から林先生が提唱されているシンプルで低侵襲・創傷治癒を妨げないインプラント外科、治療回数と期間の短縮、治療期間中における患者さんの QOL の向上、長期的視野に立った治療計画と上部構造の選択、そして審美性と清掃性を考慮した補綴形態など歯科医側のテクニック主導のインプラント治療ではなく、本当の意味での患者さん目線のインプラント治療のコンセプトをお話いただきました。

先生の持論であるフラップを開けない抜歯即時埋入と即時プロビの適応症と診断基準、従来の方法から比べたら半分以下になった治療期間。以前では考えられないことが可能になりました。林先生の実際の素晴らしい症例を交えて熱くご講演いただきました。こんなに美しい審美症例ができるのかと感動しました。林先生ありがとうございました。

午後からは、東京形成歯科研究会副会長の奥寺俊充先生が、午前中の林先生のお話を即実践する形で実際に Live ope で「上顎前歯部欠損症例に対するインプラント埋入手術」を実演されました。

抜歯後半年が経過して歯槽骨が若干薄いケースではありましたが、フラップを剥離し唇側骨板をエキスパンドしたのちにインプラントを口蓋側に低位埋入したのちヒーリングアバットを装着し唇側に P R F 膜を置いた中に A F G + バイオスを填入しナート、埋入トルクを I S Q で確認したのちプロビの作成に移るという流れでした。

手術室と研修室が直接つながっていましたので、要所要所で林先生に解説いただき、奥寺先生にもアドバイスされ、その場で確認していただくことが出来ました。

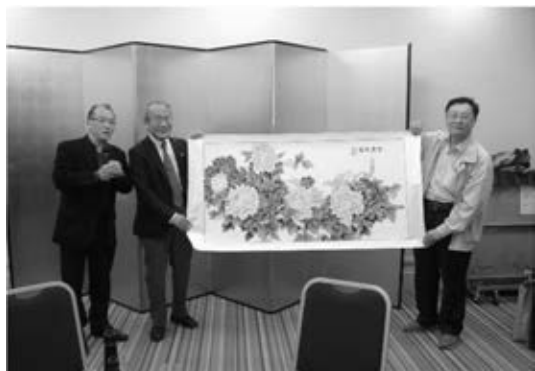
理想的な位置にインプラントが埋入され理想的な形のプロビが入り無事にオペが終了しました。多くの先生が見守る中で難しい症例を成功させた奥寺先生に感動しました。ありがとうございました。

今回このような素晴らしい講演と Live ope を企画いただきました東京形成歯科研究会の皆様、協賛いただきました白鵬様感謝いたします。ありがとうございました。

2016 年度第 4 回 再生医療 血液臨床応用「美容外科処置・ライブサージェリー」[懇親会]

日 程 2016 年 10 月 29 日 (土) 17:30～

場 所 (会 場) 北とぴあ 16F “錦の間” (東京都北区王子 1-11-1)



鈴木正史 TPDS 副会長主催 懇親会 Vice President Masashi Suzuki Sponsored Dinner

日 程 2016 年 10 月 30 日 (日) 17:30～

場 所 (会場) ルネッサンスタワー上野池之端 38F “スカイビューラウンジ”
(台東区池之端 2-1-35)



2016 年度 共同研究“TPDS×新潟大学”慰労会 (湯沢温泉)

日 程 2016 年 11 月 19 日 (土) 18:00～

場 所 (会場) 湯沢釜蔵 (新潟県南魚沼郡湯沢町湯沢 2440-10)



東京形成歯科研究会主催 懇親会 in 仙台

日 程 2017 年 9 月 22 日 (金) 18:30～

場 所 (会場) 牛たん料理 閣 (かく) ブランドーム店
(仙台市青葉区 1 番町 3 丁目 8-14 鈴喜陶器店地下 1 階)



昨年の会報誌でも掲載しておりますが、東京形成歯科研究会は平成 27 年 8 月 19 日、厚生労働省関東信越厚生局より“認定再生医療等委員会”の認定を受けております。

第 3 種の再生医療等提供計画に係る審査等業務を希望される実施医療機関は、一般社団法人東京形成歯科研究会・事務局（03-3919-5111）までお問合せ下さい。

認定証

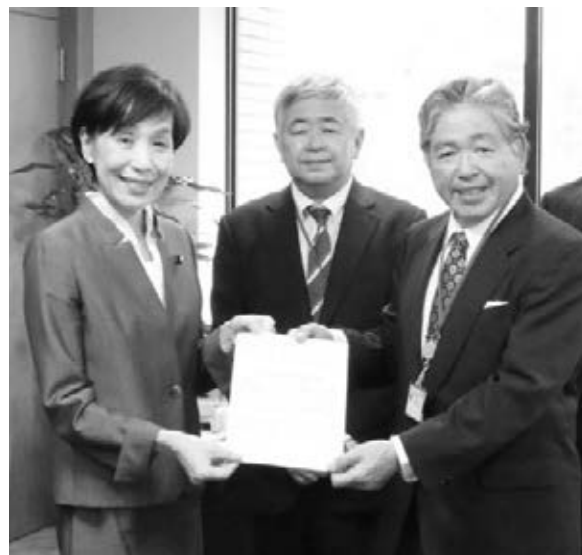


- ・厚生労働省関東信越厚生局認定
東京形成歯科研究会認定再生医療等委員会
- ・認定番号：NB3150011
- ・認定区分：第三種再生医療等提供計画のみに係る審査等業務を実施

行政・政治との折衝の場として、

一般社団法人 東京形成歯科研究会 施設長・理事長／国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB） チェアマン 奥寺 元

行政・政治との折衝の場として、医療と社会との繋がりや、無視できない。口腔疾患は社会との関連は強く、当然のことながら、先端技術・再生治療においても、その国の経済まで関与する。常に監視の目を緩めてはならない開業医の現場において、制度により開業医の現場に不利益を与えることは、患者一人一人に影響を与える結果に繋がる。近年施行された、再生医療新法において、PRP を含む第 3 種再生医療の規制については、医療現場の状況と学術的見地から改変の余地があるのではないかと様々な意見が聞こえてきます。この問題点を常に監督官庁の説明会や協議会で主張してきた。その結果、現場の事情が理解されて、歯科はこの分野での取り組みがいち早く、エビデンスの構築に寄与していることが理解されてきた。先の厚労副大臣への陳情もその一端であった。それらの、行動は評価されつつあり、特に民間組織による「…の治療を促進する会」「・・・患者とよりそう会」などアカデミックの会からも出現して、利権と圧力に影響されることを恐れ、行政側からその意見収集の座長役に指名されたことも明記したい。この様に種々の影響を及ぼす行政・政治諸問題にも向かい合っている。元来このような事案は、歯科医師会が対処することが原則論であるが、間を入れずそのような活動が出来ない現実があり会の行きづまりを感じざるを得ない。



■ [2017 年 6 月] 左より、厚生労働副大臣 古屋範子、TPDS 会長 古谷田 泰夫、TPDS 施設長 奥寺 元

元来このような事案は、歯科医師会が対処することが原則論であるが、間を入れずそのような活動が出来ない現実があり会の行きづまりを感じざるを得ない。

特定細胞加工物製造の届出／再生医療等提供計画の提出

「再生医療等の安全性の確保等に関する法律」施行 歯科医院に関連する“届出”及び“提出”について

平成 26 年 11 月 25 日に「再生医療等の安全性の確保等に関する法律（平成 25 年法律第 85 号）が施行され、多血小板フィブリンゲル PRF（CGF）や多血小板血漿（PRP, PRGF）を用いた治療を行うすべての医療機関に以下の通り“届出”及び“提出”が義務付けられました。

「再生医療等提供計画」の“提出”につきましては、添付が義務付けられている「意見書」の発行を厚生労働省関東信越厚生局認定東京形成歯科研究会認定再生医療等委員会（認定番号：NB3150011）で対応します。また、書類作成等のサポートを国際血液・幹細胞臨床応用会議（ISBB）で請け負います。“届出”及び“提出”のサポートを希望される先生は、（一社）東京形成歯科研究会・事務局（03-3919-5111）までお問合せ下さい。“届出”及び“提出”をせずに再生医療の提供を行った場合、罰則が適用されます。

「届出」及び「提出」は以下 2 つ

- ① 特定細胞加工物製造の届出
- ② 再生医療等提供計画の提出

各種申請書作成支援サイト（以下アドレス）で申請手順についてご確認ください。

<http://saiseiiryo.mhlw.go.jp/>

② 再生医療等提供計画の提出について

● 提出には厚生労働省各地方厚生局から認定を受けた“認定再生医療等委員会”での審査後、そこから発行される「意見書」を受け取り、添付することが必須です。

※ 認定再生医療等委員会について

東京形成歯科研究会は平成 27 年 8 月 19 日、厚生労働省関東信越厚生局より“認定再生医療等委員会”の認定を受けました。

厚生労働省関東信越厚生局認定東京形成歯科研究会認定再生医療等委員会

認定番号：NB3150011

「届出」及び「提出」のサポートについて

- ① 特定細胞加工物製造の「届出」及び ② 再生医療等提供計画の「提出」のサポートを希望される先生は、（一社）東京形成歯科研究会・事務局（03-3919-5111）までお問合せ下さい。

再生医療等の安全性の確保等に関する法律施行「特定細胞加工物製造の届出」提出書類内

“無菌操作区域＝クリーンベンチ”「PRP 等における操作 BOX」の案内

PRP を用いた治療をしている歯科診療所におかれましては、再生医療新法施行に伴い、“無菌操作等区域”として「クリーンベンチ」を設置する必要があります。奥寺理事長プロデュースの「PRP 等における操作 BOX」ですが、以下の通り、操作 BOX は既製品（垂直気流型クリーンブース）を採用し、二酸化塩素ガスにより殺菌状態を向上させることを目的とした製品をセットにして、ご案内します。仕様は下記をご参照下さい。購入をご希望の先生はオクデラメディカル／（一社）東京形成歯科研究会・事務局（TEL 03-3919-5111）までお問合せ下さい。尚、“簡易型”クリーンベンチにつきましては、市販されている製品は多数ございます。この限りではございません。

〔PRP 等 操作 BOX〕

■操作 BOX 「アクリルクリーンフード」 （垂直気流型クリーンブース）



■「SC パウダー」 1 箱（20 包み入り）



〔販売価格・仕様〕

■操作 BOX 「アクリルクリーンフード」 コンパクトタイプの垂直気流型クリーンブース

○販売価格 61,850 円（消費税及び梱包・発送費別途）

※BOX 底面開きタイプ・・・BOX の底面はアクリルで覆われていません。

本体サイズ：500 mm×350 mm×460 mm（W・D・H）／重量：8 kg／吹出風量：約 1m³/min／吹出風速：約 0.5m/s／

集塵効率：99.97% 以上（0.3μm 粒子）／フィルター：不織布製プレフィルター、抗菌・防臭 HEPA フィルター／

抗菌・防臭 HEPA フィルターサイズ：250 mm×250 mm×140 mm（W・D・H）／モーター：AC モーター／電源：AC100V

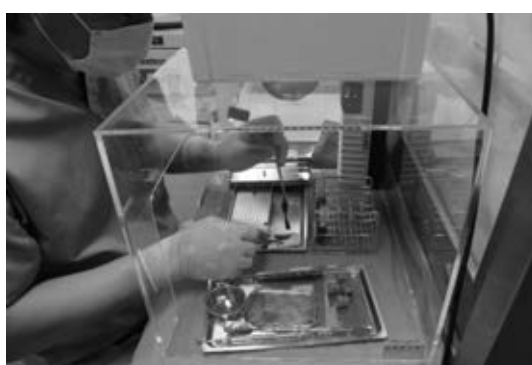
50/60Hz 36/38W／電源コード長：1.8m（2P プラグ）／フード材料：PMMA（アクリル）

■「SC パウダー」パウダー状 NaClO₂ 亜塩素酸ナトリウム ※オプション

○販売価格 1 箱（20 包み入り） 5,000 円（消費税及び梱包・発送費別途）

成分：ゼオライト、炭酸ナトリウム、亜塩素酸ナトリウム（二酸化塩素） 容量（1 包み）：2g

〔操作シーン〕



公益社団法人日本口腔インプラント学会認定施設

一般社団法人 東京形成歯科研究会

2017 年度

役 員 構 成

○ 施 設 長	奥寺 元								
○ 会 長	古谷田 泰夫								
○ 副 会 長	木下 三博	奥寺 俊允	鈴木 正史	月岡 庸之					
○ 参 与	鯨岡 昌寿	鈴木 富士雄							
○ 監 事	柳 時悦								
○ 相 談 役	鳥村 敏明	北村 豊							
○ 名誉顧問	小嶋 榮一	高戸 毅	石川 烈	白川 正順					
○ 顧 問	河奈 裕正								
○ 専務理事	押田 浩文								
○ 理 事	相澤 八大	西山 和彦	橋口 英生	原田 庸平	北村 豊	豊田 寿久	渡辺 泰典		
	関口 剛	増木 英郎	荻原 道	田中 かずさ	川端 秀男	飯塚 智彦	矢守 俊介		
	菊池 龍介	鈴木 泰二	鯨岡 創一郎	磯邊 和重					

認定再生医療等委員会

奥寺 元 奥寺 俊允 田中 かずさ 柳 時悦 石川 烈 鄭 英模 星野 達雄 柳井 樹里 押田 浩文

倫理審査委員会

奥寺 元 古谷田 泰夫 北村 豊 柳 時悦 月岡 庸之 鄭 英模 有留 涼子 押田 浩文

試験対策委員会

奥寺 俊允（委員長・統括責任者） 川端 秀男 渡辺 泰典 辻野 哲弘

学術委員会

北村 豊 豊田 寿久 奥寺 俊允 渡辺 泰典 磯邊 和重 鈴木 泰二 鯨岡 創一郎

公益社団法人日本口腔インプラント学会

○ 代議員 奥寺 俊允 古谷田 泰夫 北村 豊 柳 時悦



一般社団法人 東京形成歯科研究会



一般社団法人東京形成歯科研究会 2017年度 会報誌

2018年3月5日発行

編集・発行 一般社団法人東京形成歯科研究会
発行責任者 一般社団法人東京形成歯科研究会 施設長・理事長 奥寺 元
〒114-0002 東京都北区王子 2-26-2 ウェルネスオクデラビルズ 3F
TEL : 03-3919-5111 FAX : 03-3919-5114