

[Q & A (質問と回答)]

回答者 : 川瀬 知之 (新潟大学大学院医歯学研究科 准教授)

※以下、Q & A内の添付ファイル (資料) は運営上、公開することが困難なためご容赦下さい。

Q

連休中に PRP(1&2)の DVD を見て勉強しました。PRP と A-PRF の生成方法や概略は勉強できました。

ただ、CGF や PRGF については情報がなく、分からない状態です。

あまりにも初歩的な事で申し訳ありませんが、この二つの概略を教えてください。

スライドの中で、疑問と目的の中にある『Dohan Ehrenfest らによる初期の研究』について調べてみたのですが、探すことができませんでした。

スライドの、結論と考察に出てくる先行研究論文は、

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.

だと思いますが、まだ、読めてない状態です。

調製した各血小板濃縮材料における増殖因子(TGF- β 1, PDGF-BB, VEGF) と炎症性サイトカイン (IL-1 β , IL-6) の総量と PRP, PRGF, A-PRF, CGF の細胞増殖に及ぼす影響のスライドについては、まだ理解できていません。宜しく願いいたします。

A

ご質問ありがとうございます。先生の積極的な質問はほかの会員の先生方の刺激にもなると思いますので、これからもよろしく願いいたします。

さて、ご質問の件ですが、CGF (Concentrated growth factor)はコアフロントが国内販売している Medifuge という遠心器によって作製する PRF の改良形です。文献的には CGF という表現が少なくも PRF としているものが多いので、検索しにくいと思います。しかし、国内シェアは PRF 以上ではないかと想像しています。さきに西山先生の論文(Clin Exp Dent Res DOI: 10.1002/cre2.26, 2016)として出していますので、その中の記述を参考にしてください。東京形成の HP のなかにリンクがあると思います。

一方、PRGF (Plasma rich in growth factors)は Anitua という先生が開発した PRP の改良形ですが、白血球を含まないところが最大の違いです。論文の検索は Anitua と PRGF で試してみてください。また、西山論文やわたくしの Odontology (103:126-135; 2015)に書いた総説にも書いてありますので、参考にしてください。添付しました。

Dohan は途中で名前の表示が少し変わっているので、検索しにくいです。添付しました。Fig 7 の PRF exudate (搾り汁)と serum のデータを比較してみてください。

まだ理解できてないところがあるとご心配されるかもしれませんが、入り口がわかってくれば一気に展望も開けてくると思います。腰を落ち着けて、じっくりと取り組んでください。

Q

CGF が PRF の改良形、PRGF が PRP の改良形という事なのですね。

それであるような分類になっているのですね。

スライド4にありますヒト骨膜細胞を用いたバイオアッセイという方法はどのような方法なのでしょうか。

その結果となっているスライド7の『PRP, PRGF, A-PRF, CGF の細胞増殖に及ぼす影響』で A) PPP and PRGF と B) A-PRF and CGF を比べて、どのように読み取って、『A-PRF と CGF に細胞増殖活性がある → 含まれる増殖因子は活性型である』と分かるのでしょうか。

A

ヒト骨膜細胞のバイオアッセイについてですが、まずこの細胞を選択した理由は、歯槽骨再生や顎堤形成などにおいて重要な役割を果たしているからです。また、この実験を入れた意義ですが、ELISA による増殖因子の定量は抗原抗体反応を利用したもので、極端な場合、それらが失活していても存在しているものとして定量されます。しかし、臨床において効力を発揮するかどうかは、活性があるかどうか(活性型かどうか)にかかっているわけですから、それをバイオアッセイで確かめるということが必要性になります。

データの読み方ですが、PRP と PRGF は培地にフィブリンクロットができて、細胞をばらしてカウントすることができなくなるので、画像上で単位面積あたりに存在する細胞をカウントしました。PRP と PRGF を比較すると、PRP は用量を上げていくと、いったん増殖促進的に作用していたのが、効力を失ったようになります。これはなにか阻害因子が含まれているせいではないかと考えています。今後の課題です。

しかし、PRGF や A-PRF や CGF にはこのような「下げ」の局面は見られないのが特徴です。作業仮説としては、白血球の混入ではないかと考えていますが、それを証明するにはそれぞれのプレパレーションに含まれている白血球数をカウントしないとはいけません。しかし、フィブリンクロットである A-PRF や CGF でそれをするのが困難であることから、ここで壁に当たっています。なにかいい方策を考えないとはいけません。plasmin は一度試したことがあるのですが、濃度の設定がよくなかったのか、期待したような結果は得られませんでした。

ちなみに、CGF などに含まれる血小板数も直接カウントすることはできません。

Q

ELISA は抗原抗体反応を利用しているので、生物検定法を用いて細胞の活性の有無を調べる必要があるのですね。

スライド7の横軸の『PRP derivatives』は、PRP, PRGF, A-PRF, CGF など血液濃縮生成物といったように考えてよいのでしょうか。

このグラフで PRP は一定量以上では下向きと理解し、他の3種は一定量以上は疫学的には横ばいと理解してよかったですでしょうか。

スライド5の遠心条件ですが、rotor は回転中に横向きになるタイプを swing、角度をつけたまま固定されたタイプを angle、と理解してよかったですでしょうか。

次の段の radius は、回転半径と思いますが、これが大きいとかかる G が大きく小さいと G が小さくなりますが、(それによって抽出する濃縮生成物が異なってくるのでしょうか) この事は発表時に触れたほうが良いでしょうか。それとも必要のないことでしょうか。

病理学に所属していましたが臨床研究でしたので、病理的には、他の先生の研究のお手伝いで組織切片を数回行った程度です。ご期待に添えるような能力は持ち合わせていません。

A

スライド 7 の横軸の解釈は、そのとおりです。「一定量以上で下向き」と「横ばい」という読み取りもそれでけっこうです。

スライド 5 のローターの理解もそれでけっこうです。遠心に関しては、使用機器を明示して回転数で示すほうがわかりやすいのですが、同様の条件を異なる半径の遠心機で再現するためには G であらわす必要があります。今回は、わかりやすく併記しただけですので、発表に際しては、さらっと流していいと思います。

Q

話しが違いますが。昔から MARX 直伝 HAVEST のマシンで何度やっても PRP のゲル化はしなかった経験がありました。今回何人かの iPRF においてもトロンビンや塩化カルシウムを使用しても強い弾力のあるゲル化に成らないケースもありました。

A

昨秋 CGF がゲル化しなかった人に、先日、再度採血させてもらい遠心したら、平均以上にいい CGF ができました。原因は不明のままですが、前回の血液は白っぽかったのに対して、今回はきれいなものでした。

さて、先生の場合ですが、PRP でも PRF でもよくできないとのことですので、定石としてはプロトロンビン時間を確認するところからはじめることになると思います。

個人的には、fibrinogen の質含量に異常があるのかもしれないと懸念します。たとえば、ストレス過多で血栓ができやすい状態だと fibrinogen レベルは低下するらしいです。変換される fibrin 線維の構造にも異常が出るそうです。

あるいは、血液の粘ちょう性も、特に PRF 調製には影響があると思います。たとえば、採血 30 分前くらいにスポーツドリンクを多量に摂取して、血液を多少でもさらさらにして改善するか？

もちろん、日々の食生活でも塩分や脂肪分の摂取を控えてみることも重要かと思いますが、論文もないようなので、根拠に乏しく、焼け石に水かもしれません。

現時点では、残念ながら、この程度のことしか思い浮かびません。

Q

昨晚、原稿をイメージしてみましたが、まだまだボリュームが不足のようで半分(3分30秒)位のものでした・・・。

今後ボリュームアップのアドバイスをお願いいたします。

スライドですが、今までに学会発表用に作成した事がないため、先生の考えているような見栄えの良い物が作れる自信はありません。出来る範囲でチャレンジしてみます。

スライド 6 と 7 のグラフですが、エクセル等で数値が分かるものをいただけますでしょうか。

A-PRF, CGF, PRP, PRGF の生成中や生成後、それぞれの遠心機、ELISA キットを用いた測定中、ヒト骨膜細胞を用いたバイオアッセイ時、等の写真もしくは挿絵的な物はないでしょうか。

A

時間が短すぎるとのことですが、ポインターで指し示しながら、聴衆をときどき見渡しながら発表すると 2 割増くらいにはなります。ですから、現状としては、4 分半くらいでしょうか。さらに 2-3 分くらいは追加できるというところでしょうか。

M&M などですлайドにしてない詳細を口頭で補足することができますが、前回は書きましたが、背景のところに

西山論文を紹介して、東京形成の研究アクティビティを紹介するとともにその延長線上にこの研究があることをわかりやすく説明するということもできます。Dohan のデータを示したり、PRF に増殖因子が含まれるという反論的論文を紹介して、その相違の原因を考察する方法もあると思います。

イメージについては、西山先生のスライド(重すぎて PDF にしましたが)を添付しましたので写真を切り取って使用する手もあります。また、Google で画像を選択して ELISA など検索をかけてみてください。気に入った図があれば、それをもとに書き換えるという方法もあります。