

論文の内容の要旨

論文題目 ウマにおける新しい創傷治療法である多血小板血漿 (PRP) 療法の有用性に関する研究

氏名 福田 健太郎

ウマにとって創傷は日常的な疾患である。特に体幹部の筋挫傷ではしばしば上皮化遅延を伴い遷延化する。こうした創傷の効率的な治療法について多くの議論および提案がなされてきた。近年では創傷治療の分野でも再生医療が導入されるようになり、特に成長因子を利用した治療法が注目されている。代表的な治療法は多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) 療法である。PRP 療法とは自己血由来の血小板を濃縮して作製した PRP を用いた治療法であり、その安全性と作製および適用方法の簡便さゆえに臨床において普及が進んでいる。PRP 療法は血小板に含有されている多種多量の成長因子を損傷組織に曝露させることで組織修復が促進されることを期待して適用され、ウマ臨床では整形外科領域において有用性が報告されている。一方、治療に用いられる PRP の作製方法や適用方法が標準化されておらず、このことによる血液学的特性や含有成分の相違が治療の有用性を不明瞭にさせている。本研究ではウマ創傷治療法として有用な PRP 療法を確立するために、高濃度の成長因子を含んだ PRP を確実に患部に適用することを目指し、まず創傷治癒に有用な成長因子を最大限に含んだ PRP の作製および活性化方法の標準化を行った。次に、高濃度の成長因子を含んだ PRP を健常な骨格筋内に投与することによりもたらされる筋肥大効果や有害事象の発現の可能性を検討するため組織学的および分子生物学的検索を行った。さらに、実験的に作製された骨格筋損傷モデルに対して活性化 PRP を投与し、PRP が創傷治癒過程に及ぼす影響について組織学的および分子生物学的に検討した。最後に、筋損傷モデルに対する投与結果を基にして、筋挫傷を伴う創傷症例に対して PRP 療法を応用し、創傷治療法としての PRP 療法の有用性や効率的な適用方法について検討した。

PRP 作製方法については効率的な方法として普及している 2 段階遠心法（ダブルスピン法）を採用し、160×g、400×g、900×g および 2,000×g の 4 種類の相対遠心力を組み合わせることで血小板濃度が高く白血球濃度が低い PRP の作製方法を比較検討した結果、ウマ由来の静脈血を 400×g で 7 分間遠心した後に得られた血漿成分をさらに 2000×g で 7 分間遠心し、上清を廃棄した後に残った少量の血漿によって残渣を懸濁して作製する方法が最適と考えられた。また PRP の活性化方法については、一般的に普及している凍結融解法とカルシウム自己血清添加法を採用し、活性化方法の相違が PRP に含まれる血小板由来成長因子 (PDGF-BB) およびトランスフォーミング増殖因子-β1 (TGF-β1) 濃度におよぼす影響を比較した。この結果、1 回の凍結融解よりもカルシウム添加法において PRP 上清中 PDGF-BB が著しく高濃度であった一方、2 回の凍結融解処理によってカルシウム添加法と同等の濃度を示した。一方、TGF-β1 濃度については活性化方法の相違による濃度差は見られなかったが、PDGF-BB 同様に 1 回よりも 2 回凍結融解させた方が上清中濃度は高値を示した。さらに両方の成長因子について、2~4 回の凍結融解処理によって得られた PRP 上清中濃度に差が見られなかった。これらのことから、2 回凍結融解法は PRP 上清中成長因子濃度を簡便かつ安定的に高濃度にする活性化方法として最適であった。

最適化された方法によって作製および活性化された PRP を健常な骨格筋内に投与したが、周囲の筋組織に形態学的変化をもたらさなかった。このことから、PRP には筋組織の形態を著しく変容させるほどの力価はなく、筋力増強を目的とした PRP の使用は現実的でないと考えられた。一方、投与部の筋組織で筋線維の分化に関連する *MHC-e* 遺伝子発現量が増強されたことから、骨格筋の損傷に対する PRP 投与によりサテライトセルの増殖あるいは分化過程が活性化され治癒が促進される可能性が考えられた。さらに、PRP 投与によるネガティブエフェクトの所見は認められず、PRP 投与により筋組織で有害事象が生じる可能性は低いと考えられた

局所麻酔薬ブピバカインを筋肉内投与することにより、投与した PRP が著しい局所出血

により流出する懸念の少ない骨格筋損傷モデルの作製法を確立した。このような骨格筋損傷モデルに対して活性化 PRP を投与した結果、PRP 由来の成長因子は 2 日以内に投与組織から消失したが、筋修復に関わる成長因子、サイトカインおよびサテライトセル増殖に関わる遺伝子はその後も高発現を示し、組織レベルでも筋管形成が促進した。さらに、PRP 投与によって筋分化に関わる *myogenin* 遺伝子が損傷 7 日後に低発現を示しており、筋修復過程の初期段階が早期に終息したと考えられた。

PRP 由来成長因子が投与組織におよぼす影響が短期的である可能性が考えられたため、筋挫傷を伴うウマ損傷症例 2 例に対して、PRP に含有されている高濃度の成長因子が長期間患部に曝露されるように投与すると、良性肉芽の増生や創収縮が進み、遷延化していた組織修復が促進した。また有害事象も認められなかった。これにより、創傷治療に対して簡便、安全かつ有用なウマ PRP 療法を確立することができた。