

審査の結果の要旨

氏名 福田 健太郎

ウマは外傷を負うことが多い動物であり、特に競走馬では創傷が日常的に生じる疾患としても高い比率を占めている。そして、ウマにおける創傷は、炎症の慢性化や過剰な肉芽増生のために治療が長期間に及ぶことも少なくない。このことの原因として患部の低酸素、低温や成長因子の不均衡が挙げられ、創傷の正常な治癒機転が機能し難くなることで症状が遷延化しやすいと考えられているが、創傷の治療法に関しては長年にわたって多くの議論や提案がなされてきてはいるものの、未だ効率的な治療法が確立しているとは言えない。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。その代表的な治療法が、自己血由来の血小板を濃縮させて作製された多血小板血漿 (platelet-rich plasma; PRP) を用いた PRP 療法であり、その安全性と簡便性からヒトの臨床においては、口腔外科や整形外科領域において普及が進んでいる。ウマの臨床における PRP 療法では、血小板に含有されている多種多量な成長因子が損傷組織に曝露されることにより組織修復が促進されることを期待して整形外科領域において試みられた経緯はあるものの、治療に用いられる PRP の作製方法や使用方法が未だに標準化されていないのが現状である。そこで申請者は、ウマにおける優れた創傷治療法として PRP 療法の確立を目的として、PRP の最適な作製方法と活性化方法を見出しその筋損傷に対する新たな治療法としての有効性について検討を行っている。

提出された博士論文は 6 章から構成されている。第 1 章では、研究の背景および目的を述べている。

第 2 章では、治療に使用するための最適な PRP を得るために、含有されている成長因子の濃度が最大となるような PRP の作製方法と活性化方法について検討している。ウマより採血した静脈血を用いて、まず様々な遠心条件による 2 段階遠心法によって PRP を作製した結果、赤血球と白血球の混入が最小限となるような PRP を作製する場合には 400 x 2000g が最適な条件であることを見出した。そして、PRP の活性化方法については、最低 2 回の凍結融解処理することにより PRP 上清中の組織修復に関与する代表的な成長因子として血小板由来成長因子 (PDGF-BB) とトランスフォーミング増殖因子 - β 1 (TGF- β 1) の含有濃度が高くなることを見出した。したがって、最適かつ簡便に活性化された PRP を作製するには、400 x 2000 g の遠心条件で 2 回遠心して作製した PRP を 2 回以上凍結融解すればよいことを明らかにした。

第 3 章では、前章で得られた結果を基に作製した PRP を、実際にウマの健常な骨格筋に単

回投与した際の影響について組織学的および分子生物学的に検討している。その結果、筋線維の分化に関連する遺伝子である *MHC-e* や *MHC-1* の発現量に増加が認められたことから、サテライトセルの増殖を必要とするような損傷に対しては筋分化過程を活性化させる可能性のあることを見出した。一方、筋修復に関与する成長因子やサイトカインの遺伝子に顕著な差異を認めなかった。そして、PRP の投与は健常な筋線維自体や周囲の組織には形態学的に顕著な変化を誘発しなかった。これらの結果から、PRP の投与が筋力増強を目的としたドーピングや臨床応用する際の安全性面から副反応を及ぼす可能性の少ないことを示唆している。

第4章では、実験的に作製された骨格筋損傷モデルに対して PRP を投与し、その筋修復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を行っている。実験的な骨格筋損傷モデルには、実際の病態や筋損傷の修復過程を反映しているのみならず、投与された薬液が出血により患部から排出され投与効果が不明瞭になることを防ぐため、作製時における出血を最小にすることが求められる。局所麻酔薬であるブピバカインの筋肉内投与が、マウスやラットで筋細胞膜のみを破壊し出血を最小限にすることが証明されていることから、ウマの中殿筋にこの方法を応用し筋損傷モデルの作製を試みた。その結果、ブピバカイン 10ml の筋肉内投与により、一般的な筋損傷修復過程を反映した病変を再現性良く広範囲に作製可能なことを明らかにした。本モデルを用いて PRP の有効性について調べたところ、PRP 由来の成長因子は投与 2 日後には消失するものの、筋修復に関与する成長因子やサイトカインに加えてサテライトセル増殖に関わる遺伝子の発現はその後も高いレベルに維持された。一方、筋分化に関わる遺伝子は投与 7 日では PRP 投与群で低値を示した。これらのことから、PRP 投与は損傷部位における筋再生を促進しより早く筋修復過程の初期段階を終息させることを示唆している。

第5章では、筋損傷を伴う創傷症例に対して実際に PRP 療法を適用して本法の有用性について検討している。外科手術によっても完治しなかった重症な創傷を受傷したウマ 2 頭を用いて、創傷部位に PRP を投与することにより、創の湿潤状態や良性肉芽の増生が誘導され、その後、創が収縮を経て閉鎖し治癒に至ったことを確認している。また、有害事象も認められなかったことから、創傷に対する PRP 治療が簡便で有用な治療法であることを臨床的にも明らかにしている。

第6章では、得られた知見に関して総括をしている。

以上のように、本論文ではウマにおける PRP の作製方法からその有効性について実験的モデルおよび臨床応用も含めて検討し PRP 療法の有用性を明らかにしている。これらの研究成果は、ウマにおける新たな創傷治療法として非常に有用な知見を提供しており、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（獣医学）の学位論文として価値あるものと認めた。