氏 名(本籍)	山口 龍志郎(やまぐち りゅうしろう)(東京都)
学位の種類	博 士(医 学)
学位記番号	博 甲 第 5946 号
学位授与年月日	平成23年11月30日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	**濃厚血小板血漿ペースト剤による上部消化管吻合部創傷治癒促進効果** －血小板濃度の重要性－

主 査	筑波大学教授	博士(医学)	水 谷 太 郎
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	森 下 由紀雄
副 査	筑波大学准教授	医学博士	鬼 塚 正 孝
副 査	筑波大学准教授	博士(医学)	坂 根 正 孝

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

消化管手術の領域において、消化管吻合部の縫合不全は手術患者において致死的な合併症である。縫合不全の発生を予防するため、創傷治癒プロセスに踏み込んだ新治療戦略を開発する必要がある。筆者が着目したのは多血小板血漿(PRP: Platelet-Rich Plasma)である。消化管外科領域以外の分野、特に整形外科領域では、血小板をペースト状にして創部に塗布すると、創傷治癒が促進されることが報告されている。PRPは血小板中に含まれる多種のgrowth factorを徐放的に放出し組織修復を促進する。しかし、PRPの効果は未だ不明な点も多く、無効とするものやむしろ創傷治癒を阻害するといった報告もある。この原因として、これまで報告された多くの論文においてPRPの作製方法やPRP中に含まれる血小板濃度が報告毎に異ることが原因と推測された。これまで消化管吻合部にPRPを応用した論文は稀であり、その創傷治癒促進効果について一定の結論が得られていない。本研究の目的はPRPに含有される血小板濃度と空腸吻合部創傷治癒促進効果の関係を解明することである。

(対象と方法)

①PRP作製：生後6週齢雄SDラット(体重約200 g)より採血(10% ACD-A液を混合)し、2回の遠心分離にてPRPを採取し、Platelet-poor plasma(PPP)にて濃度を調節し、低濃度PRP($2 \times 10^6/mm^3$、全血の約2倍)、高濃度PRP($5 \times 10^6/mm^3$、全血の約5倍)を作成し、Bovine thrombinと$CaCl_2$を加えゲル化させた。②増殖因子の定量：PPP、低濃度PRP、高濃度PRPのPDGF-BB、TGF-B1を測定した。③実験モデル：上記ラットを用いて、中心静脈カテーテルの挿入、上部空腸の切離・吻合を行った。吻合部へPPP、低濃度PRP、高濃度PRP(0.21 ml)を塗布した(PPP群、L-PRP群、H-PRP群)。これに吻合のみを行ったControl群を加えて計4群とした(各n=12)。術後はTPN(151 kcal/kg/day)により栄養管理を行った。④創傷治癒の評価：5PODに体重変化、尿量、血液生化学的検査を行った後、Anastomotic Bursting Pressure(ABP)および吻合部組織のHydroxyproline(HYP)濃度を測定した。さらに、吻合部の組織学的検討を行った(ヘマトキシリン－エオジン(HE)染色、マッソン－トリクローム(MT)染色、alpha-smooth muscle actin(SMA)

染色、proliferating cell nuclear antigen（PCNA）染色）。測定値はmean ±SDで表示し、ANOVA、Bonferronitestにより統計学的検定を行った。

（結果）

PDGF-BB、TGF-B1濃度は、PRP濃度依存的に増加した。5PODの栄養学的評価では、各群間に有意差を認めなかった。ABP（mmHg）は、L-PRP群189 ± 17 > Control群171 ± 20、PPP群174 ± 23 > H-PRP群148 ± 25であった。同様に、HYP濃度（μg/g dry tissue）も、L-PRP群629 ± 120 > Control群516 ± 130、PPP群495 ± 123 > H-PRP群407 ± 143を示した。L-PRP群のABPとHYP濃度は、他の3群に比して、有意に高値であり（$P<0.05$）、H-PRP群では有意に低値であった（$P<0.05$）。吻合5日目の病理組織学的所見において、L-PRP群では消化管漿膜面で最もコラーゲンの堆積を認め、他3群と比較すると明らかにコラーゲン産生の増加を認め、肉芽組織が明確に増生していた。それに対し、H-PRP群では4群のうちコラーゲン産生の減弱を認め肉芽組織の増生が明らかに不良であった。control群とPPP群では差は認められなかった。また線維芽細胞数については、L-PRP群において最も筋線維芽細胞の増生が低く、線維芽細胞の増殖能についてはH-PRP群でPCNA陽性線維芽細胞を最も多く認め、線維芽細胞増殖能の増強を認めるという肉芽増生の点から考慮すると矛盾する結果となった。

（考察）

PRPの創傷治癒促進効果は、血漿成分ではなく、血小板自体に由来することが示唆された。低濃度PRP（2倍）は吻合部創傷治癒を有意に促進し、一方高濃度のPRP（5倍）は有意に阻害したことから、PRPによる消化管吻合部の創傷治癒促進効果は含有される血小板濃度によって異なることが示唆された。これによってPRPが最大限に創傷治癒促進効果を発揮するためには、最適な血小板濃度が存在することが考えられた。これまでPRPの血小板濃度によっては創傷治癒に対し促進にも阻害にも作用する、とした報告はなく新規の知見である。また、高濃度PRPが創傷治癒を阻害するメカニズムは不明であり、更に低濃度PRPにおいて肉芽組織の増生にもかかわらず筋線維芽細胞の増生、線維芽細胞増殖能の増強が認められなかった点についても不明である。

PRPの消化管吻合部治癒促進効果は血小板の作用に由来し、含有される血小板濃度によってその効果が異なり、ある濃度では創傷治癒を促進するが高濃度では創傷治癒を阻害することが示された。今後、吻合部創傷治癒を促進する最適な血小板濃度を解明し、創傷治癒を促進または阻害する機序を解明するため、更なる研究が必要である。

審査の結果の要旨

platelet-rich plasma（PRP）は、整形外科、口腔外科、皮膚科領域等で研究実績があるが、消化管吻合への応用は報告も少なく新しい試みであり、興味深く有意義な研究テーマと考えられる。本研究に関連して、創傷治癒の経時的評価、至適血小板濃度、創傷治癒促進のメカニズム、寄与する増殖因子の特定、気道・脈管等への応用の可能性など、様々な発展性が想定される。更なる研究の進展に期待したい。

平成23年10月12日、博士（医学）学位論文審査専門委員会において審査委員全員出席のもとに最終試験を行い、論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行った結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。