

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

著者	山口 龍志郎
内容記述	筑波大学博士（医学）学位論文・平成23年11月30日 授与（甲第5946号）
発行年	2011
URL	http://hdl.handle.net/2241/117761

氏名(本籍)	山 <small>やま</small> 口 <small>ぐち</small> 龍志郎 <small>りゅうしろう</small> (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な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)

① PRP 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 ($2 \times 10^6/\text{mm}^3$ 、全血の約 2 倍)、高濃度 PRP ($5 \times 10^6/\text{mm}^3$ 、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- β 1 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、Bonferroni test 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 $189 \pm 17 >$ Control 群 171 ± 20 、PPP 群 $174 \pm 23 >$ H-PRP 群 148 ± 25 であった。同様に、HYP 濃度 ($\mu\text{g/g dry tissue}$) も、L-PRP 群 $629 \pm 120 >$ Control 群 516 ± 130 、PPP 群 $495 \pm 123 >$ 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。