

論文概要

○論文題目

「多血小板血漿による
半月板損傷の組織修復促進に関する研究」

○指導教員　：　山崎　正志

人間総合科学研究科　疾患制御医学専攻　整形外科　教授

筑波大学大学院　人間総合科学研究科　疾患制御医学専攻

新井　規仁

【目的】

Leukocyte-poor platelet-rich plasma (Leukocyte-poor PRP) が組織修復を促進させる効果を組織学的に検証すべく、半月板単独損傷モデルとして臨床的に頻度が多い縦断裂モデルと、臨床的に横断裂や水平断裂で生じた欠損に Fibrin clot が用いられるような損傷形態を想定しパンチ欠損の2つを検証した。パンチ欠損については径 1.5mm と径 2.0mm を使用した報告があるため、至適サイズをまず検討した。

本研究の仮説は、「Leukocyte-poor PRP が半月板損傷後の組織修復を促進する」である。本研究の目的は、以下の3つである。

1. 家兎半月板縦断裂モデルに対する PRP の組織修復効果を検証すること
2. 家兎半月板パンチ欠損モデルの至適サイズを検証すること
3. 家兎半月板パンチ欠損モデルに対する PRP の組織修復効果を検証すること

<①家兎半月板無血行野縦断裂モデルに対する PRP の組織修復効果を検証すること>

【対象と方法】骨格的に成熟した家兎内側半月板前節無血行野に 3mm 縦断裂を作成し、右膝を断裂群、左膝を縫合群と縫合+PRP 群とした。縫合は inside-out 法で nylon 糸 1 針の垂直縫合とした。末梢血 20 mL を PRGF system を用いて 1800rpm 8 分で遠心分離を行い、Leukocyte-poor PRP 1.5ml を抽出した。PRP 群についてはその形態によってさらに 3 群に分けた(Liquid 群; 活性化せず液体状態で滑膜に注射。Clot 群; CaCl₂ で活性化させ clot 状態で縫合部直上に留置。Membrane + supernatant 群; clot からさらにガラス棒で攪拌し固形化させたものとその上澄み。)。12 週で血液学的評価と半月板の肉眼的点数化(modified Miguel's scoring system)および組織学に修復面積比(修復面積/欠損面積)、点数化(modified Zellner's scoring system) を評価した。

【結果】血小板濃度は peripheral blood (PB), platelet-poor plasma (PPP), PRP: 29.0×10^4 , 30.8×10^4 , $75.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ で PRP の血小板濃縮率は 2.6 倍。Leukocyte-poor PRP. PAW 分類; P2-x-B β 。肉眼的および組織学的点数化では、断裂群と縫合群、縫合+PRP 群に差は見られず、修復されなかった。

【考察】Leukocyte-poor PRP の調製は過去の報告通り、ヒトの治療に使用する PRP の基準である $30.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$ を満たしていたが、家兎の半月板組織修復に至適な血小板濃度は分かっていない。過去の基礎研究では、半月板断裂に対する Leukocyte-rich PRP の組織評価がなされたが修復効果は報告されず、他の生物学的な修復手段である、骨髓血や Synovial rasping でも組織修復は得られなかった。これらは半月板無血行野縦断裂モデルの限界を示

唆している。PRP の形態による差はなかったが、われわれの先行研究である家兎膝関節内側副靭帯損傷や家兎坐骨神経損傷に対する組織修復効果は PRP clot で報告しており、扱いやすく、局所に留まるという特徴をもつことから、PRP の形態は clot として実験を行うこととした。

【結論】家兎内側半月板無血行野の縦断裂モデルでは血小板数 $75.8 \times 10^4 / \mu\text{l}$ 、PAW 分類で P2-x-B β の Leukocyte-poor PRP を用いた場合、12 週で組織修復は見られなかった。PRP の形態によって半月板の組織修復に違いはなく、過去の文献とわれわれの先行研究より、PRP の形態は Clot として実験を行うこととした。

<②家兎半月板無血行野パンチ欠損モデルの至適サイズの検証>

【対象と方法】骨格的に成熟した家兎内側半月板前節無血行野に径 1.5mm パンチ欠損を作成する。径 1.5 mm と径 2.0 mm で 2 群に分けた。片膝にパンチ欠損を残したまま閉創した。4 週で評価を行った。肉眼的には欠損残存の有無および作製した欠損の面積を測定し、組織学的には作製した欠損の断面距離を測定した。

【結果】肉眼的に欠損残存の有無を比較すると、径 1.5mm、径 2.0mm とも差なし。半月板内縁に陥凹を認めたものは、径 1.5 mm が 0 膝に対して径 2.0 mm は 2 膝で認め、いずれも欠損がなく修復組織で充填されていた。肉眼的欠損面積は径 1.5 mm 群; $0.97 \pm 0.03 \text{mm}^2$ (55.0 %), 径 2.0 mm 群; $1.22 \pm 0.39 \text{mm}^2$ (38.9 %). 組織学的な欠損部断面距離は径 1.5 mm 群; $749.6 \pm 120 \mu\text{m}$ (50.0 %), 径 2.0 mm 群; $749.8 \pm 143.6 \mu\text{m}$ (37.5 %). いずれも差はなかった。

【考察】家兎半月板の過去の報告では、パンチ欠損自体の変形や断面距離の評価は行われていない。半月板パンチ欠損は少なからず半月板の長軸方向に楕円形に伸びて変形し、短軸の欠損距離は短縮しており、径 1.5 mm より径 2.0 mm の方が変形していた。径 2.0 mm で作製した欠損半月板 3 膝のうち 2 膝は半月板内縁が陥凹し形態が破綻することで更に欠損面積・断面距離が減少し、組織が充填しやすい状態となり修復されたように見えたと考えた。

【結論】家兎半月板パンチ欠損モデルで組織修復の影響を検討するには、欠損作製部の変形による影響が少ない径 1.5 mm が至適サイズと考えた。

<③家兎半月板無血行野パンチ欠損モデルに対する PRP の組織修復効果を検証すること>

【対象と方法】骨格的に成熟した家兎内側半月板前節無血行野に径 1.5mm パンチ欠損を作成し、右膝を欠損群、左膝を PRP 群の 2 群に分けた。末梢血 20 mL を PRGF system を用

いて 1800rpm 8 分で遠心分離を行い, Leukocyte-poor PRP 2ml を抽出し, うち 1ml を CaCl_2 で活性化させ clot 状態で投与する. 4,8,12 週で, 血液学的評価と半月板の肉眼的欠損残存の有無および組織学に修復面積比(修復面積/欠損面積), 点数化(modified Zellner's scoring system) を評価した. 統計学的に Wilcoxon の符号付順位検定を用い, $p < .05$ を有意差ありとした.

【結果】血小板濃度は末梢血, PRP: 25.9×10^4 , $74.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ で PRP の血小板濃縮率は 2.9 倍であった. PAW 分類では P2-x-B β . 4 週/8 週/12 週の順に, 中央値(最小値, 最大値)で示す. 肉眼的欠損残存ありは, 欠損群 2/0/0 膝, PRP 群 0/1/0 膝であった. 組織学的には修復面積比は, 4 週で欠損群; $63.5 \pm 13.4 \%$, PRP 群; $81.5 \pm 8.0 \%$, 8 週で欠損群; $98.9 \pm 9.8 \%$, PRP 群; $85.1 \pm 10.8 \%$, 12 週で欠損群; $98.8 \pm 9.6 \%$, PRP 群; $96.0 \pm 18.1 \%$ であり, 4 週で PRP 群の方が欠損群より有意に高値であった. 点数化では, 4 週で欠損群; 9.8 ± 2.3 点, PRP 群; 15.0 ± 1.6 点と PRP 群が欠損群より有意に高い点数であった. 8 週は欠損群; 15.8 ± 1.6 点, PRP 群; 15.0 ± 1.6 点, 12 週は欠損群; 16.0 ± 1.7 点, PRP 群; 17.0 ± 1.2 点と差を認めなかった.

【考察】Leukocyte-poor PRP の調製は過去の報告通り, ヒトの治療に使用する PRP の基準である $30.0 \times 10^4 / \mu\text{l}$ を満たしていたが, 家兎の半月板組織修復に至適な血小板濃度は分かっていない. 本研究の PRP 群では, 過去の報告(Mesenchymal stem cells (MSCs) や Bone marrow (BM) を移植した)が 12 週で欠損が充填されたのと比較して早期から修復組織で覆われた. また, 組織学的にも欠損群に比べて有意に高値であったことは, PRP 群において半月板組織の修復が量的に促進されたことを示唆している. 組織学的な点数化では, 4 週において「合計」で PRP 群が欠損群より有意に高値であり, PRP 群で半月板組織の修復が質的にも促進されたことを示唆している. 点数化の各項目をみると, 本研究は「Defect」が 4 週で PRP 群の方が有意に高値であった. 過去の報告では *In vitro* で半月板内縁 2/3 から単離した細胞を Leukocyte-rich PRP と培養すると, 細胞が増殖し, 硫酸グリコサミノグリカン を合成したとされ, PRP から放出された PDGF, TGF- β 1 が半月板細胞に作用することで「Cell morphology」, 「Content of PG」に関与し, 半月板の早期修復に寄与した可能性がある.

【結論】家兎内側半月板無血行野の径 1.5 mm パンチ欠損モデルに対して, $74.4 \times 10^4 / \mu\text{l}$ の血小板数で PAW 分類 P2-x-B β の Leukocyte-poor PRP によって組織修復を促進する効果が示唆された.